Kinetik und Wirkungsmechanismus der Alanin Dehydrogenase aus Halobakterium salinarium

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Abteilung für Naturwissenschaftlichen Medizin an der Ruhr-Universität Bochum

von

Karl Arnold Hilgenstock

aus

Essen

Diss. Bochum 1983

UNIV.
LIBRARY
CAL.

Kinetik und Wirkungsmechanismus der Alanin Dehydrogenase aus Halobakterium salinarium

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Abteilung für Naturwissenschaftlichen Medizin an der Ruhr-Universität Bochum

von

Karl Arnold Hilgenstock

aus

Essen

Dissertation eingereicht am 11.05.1983

Disputation am 07.09.83

Referent : Prof.Dr. Holldorf

Korreferent: Prof. Dr. Hanstein

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Materialien und Methoden	5
2.1.1.	Biologisches Material	5
2.1.2.	Anzuchtmedien und Kulturbedingungen	5
2.2.	Analytische Methoden	6
2.2.1.	Proteinbestimmung	6
2.2.2.	Polyacrylamidelektrophorese	6
2.2.3.	Färbemethoden von Polyacrylamidgelen	6
2.2.3.1.	Proteinfärbung	6
2.2.3.2.	Nachweis der Alanin Dehydrogenase Aktivität in Polyacrylamidgelen	7
2.3.	Synthesen	8
2.3.1.	Hydroxylapatit	8
2.3.2.	Hydrophobes Gel	8
2.3.2.1.	Synthese	8
2.3.2.2.	Bestimmung der gebundenen Alkylaminreste	9
2.4.	Messung der Enzymaktivität	9
2.5.	Methoden der Enzymreinigung	10
2.6.	Herkunft der verwendeten Chemikalien	11
3.	Ergebnisse	12
3.1.	Synthese der Octylamin Sepharose 4B	12
3.2.	Reinigung der Alanin Dehydrogenase	13
3.2.1.	Liste der verwendeten Puffer	13
3.2.2.	Reinigung	14
3.2.2.1.	Gewinnung des Rohextraktes	14
3.2.2.2.	Ammoniumsulfatfällung	14

3.2.2.3.	Batchverfahren an Sepharose 4B	14
3.2.2.4.	Chromatographie an Sepharose 4B	15
3.2.2.5.	Chromatographie an DE 52 - Cellulose	15
3.2.2.6.	Hyroxylapatitchromatographie	16
3.2.2.7.	Hydrophobe Chromatographie	17
3.3.	Kinetische Untersuchungen	20
3.3.1.	Bestimmung der kinetischen Konstanten	22
3.3.2.	Produkthemmung	31
3.3.3.	Bestimmung der kinetischen Konstanten von Substratanalogen	55
3.3.4.	Kinetische Untersuchungen von Cofaktor analogen Substanzen	55
3.3.5.	Untersuchung verschiedener Hemmstoffe	57
4.	Diskussion	60
5.	Zusammenfassung	72
6.	Verzeichnis der Abkürzungen	74
7.	Literaturverzeichnis	75

1. Einleitung

Die L - Alanin Dehydrogenase (L - alanine - NAD^+ oxidoreductase (deaminating) EC 1.4.1.1) kommt in vielen Mikroorganismen vor. Sie wurde bisher aus einigen Bakterienstämmen in reiner oder angereicherter Form erhalten. (7, 25 - - 28, 30,31). Das Enzym findet sich sowohl in vegetativen Zellen wie auch in Sporen von verschiedenen Bacillus Spezies. Einige Autoren sehen die Alanin Dehydrogenase als das Schlüsselenzym beim Abbau von Alanin an, wenn Sporen auskeimen (32 - 34).

Die Reaktionsgleichung der Alanin Dehydrogenase lautet:

$$(1)\ \text{Pyr} + \text{NADH} + \text{NH}_3/\text{NH}_4^+ \rightleftharpoons \text{Ala} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$$

Das Molekulargewicht des Enzyms aus B. subtilis beträgt rund 230 000 d (35, 36), für die Alanin Dehydrogenase aus B. sphaericus werden ebenfalls 230 000 d angegeben (30). Nach Yoshida (37, 38) bzw. Ohashima et. al. (30) bestehen diese mesophilen Dehydrogenasen aus je sechs identischen oder zumindest sehr ähnlichen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 38 000 d. Die Alanin Dehydrogenase aus Halobakterien ist anders aufgebaut. Sie wurde zuerst von Holmes et. al. (39) beschrieben. Nach Keradjopoulos (6) hat das Enzym aus H. salinarium ein Molekulargewicht von etwa 60 000 d, Kim und Fitt (7) finden für die Alanin Dehydrogenase aus H. cutirubrum rund 72 000 d. Die Autoren konnten keine Untereinheiten nachweisen.

Nach Gibbons (61) sind die meisten Stämme der Halobakterien obligat aerob, aber es sind auch anaerobe und fakultativ aerobe bekannt. Für ein optimales Wachstum werden Medien mit mehr als 20% Kochsalz benötigt, die außerdem noch kleine Mengen von Kalium und Magnesium sowie Spuren von Eisen und Mangan enthalten müssen (29).

Um die unter diesen Bedingungen auftretenden osmotischen Drucke zu kompensieren, haben sich die Halobakterien an extrem hohe intrazellulare Salzkonzentrationen adaptiert. Die Ionenstärken von Medium und Zellinnerem sind etwa gleich hoch. Die K^+ - Ionen Konzentration des Zytoplasmas ist verglichen mit der des Mediums um mehr als das hundertfache angereichert. Die Na^+ - Ionen Konzentration ist innerhalb der Zelle kleiner als außerhalb. (41 - 44, 62)

Neben sehr hohen Salzkonzentrationen sind für das Wachstum der Halobakterien Peptide und Aminosäuren notwendig (53, 54). Kohlenhydrate werden in den meisten Fällen nicht verwertet, der Kohlenstoffbedarf wird weitgehend aus dem Aminosäurestoffwechsel gedeckt. Systematische Untersuchungen zum Stoffwechsel der Halobakterien sind bisher jedoch kaum ausgeführt worden.

Die Zellwand vieler Stämme der Halobakterien enthält Retinal, das kovalent an ein Rhodopsin ähnliches Protein gebunden ist und deshalb Bakteriorhodopsin genannt wird. Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre haben ergeben, daß das Bakteriorhodopsin ein wesentlicher Bestandteil einer mit Licht betriebenen Protonenpumpe darstellt. Auf diese

Energiequelle greifen die Halobakterien bei der Aufrechterhaltung des großen K^+ - Ionen Gradienten an ihrer Zellmembran zurück. (63, 64) Sie sind damit in der Lage, direkt Sonnenlicht als Energiequelle auszunutzen. Halobakterien führen also eine primitive Art der Photosynthese aus. Im Gegensatz zu den Pflanzen wird dabei jedoch ein anderer Spektralbereich genutzt.

Entsprechend der Anpassung der Lebensweise an hohe Kochsalzkonzentrationen haben auch viele Enzyme eine Änderung ihrer physikalischen Eigenschaften in dieser Richtung durchlaufen. Sie benötigen hohe Salzkonzentrationen zur Aufrechterhaltung ihrer Aktivität. Dazu gehören die Aspartat Transcarbamylase (45), die Cytochrom Oxidase (46, 47) und die Citrat Synthase (EC 4.1.3.7) (48). Andere wie die Isocitrat Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) aus H. cutirubrum und aus H. salinarium (49 - 51) werden von extrem hohen Salzkonzentrationen, wie sie die erste Gruppe benötigt, inhibiert. Die Fettsäure Synthetase aus H.cutirubrum (52) und die Amylase (EC 3.2.1.1.) aus H. halobium (40) schließlich haben ihre höchste Aktivität bei Salzkonzentrationen von weniger als 0,5 M.

Die Alanin Dehydrogenase aus H. salinarium gehört zur ersten Gruppe. Für volle enzymatische Aktivität werden Salzkonzentrationen von mehr als 2,0 M benötigt. Bei geringeren Ionenstärken wird das Enzym reversibel inaktiviert (6).

LONDON

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der Alanin Dehydrogenase. Es wird versucht, eine Antwort auf die Frage nach

dem Reaktionsmechanismus zu finden. Die Adaptation an die hohen intrazellulären Salzkonzentrationen hat zu Änderungen der Physikalischen Eigenschaften des Proteins geführt. In der Arbeit soll festgestellt werden, ob auch der kinetische Mechanismus des Enzyms von der Entwicklung zur Halophilie beeinflußt worden ist. Dieser Ansatz läßt aber keine Aussage über die Stellung der Alanin Dehydrogenase im Stoffwechsel der Halobakterien zu. Diese muß weitergehenden Untersuchungen überlassen bleiben.

2. Materialien und Methoden

2.1.1. Biologisches Material

Für die Gewinnung der Alanin Dehydrogenase werden Zellen des Stammes H a l o b a k t e r i u m s a l i - n a r i u m ATCC 19700 verwendet.

2.1.2. Anzuchtmedien und Kulturbedingungen

Die Züchtung erfolgt im Flüssigmedium nach Mohr und Larsen (1) :

250 g NaCl
10 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
5 g KCl
0,2 g $CaCl_2$ x 6 H_2O
10 g Yeast Extract
2,5 g Trypton
ad 1000 ml Medium

Die Bakterien werden in einem Fermenter der Firma B. Braun, Melsungen, Typ BIOSTAT V gezüchtet (Volumen: 8,5 l) Bei 43 °C und einer Belüftungsrate von 0,6 l Luft je Liter Kultur und Minute beträgt die Generationszeit etwa 9 Stunden.

Als Erntezeitpunkt wird die späte logarithmische Phase gewählt, da dann die spezifische Aktivität des Rohextraktes am höchsten ist (bis 0,5 U/ml). Je Liter Kultur werden 3 - 4 g Bakterien (Feuchtgewicht) erhalten.

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. Proteinbestimmung

Für Lösungen mit Proteinkonzentrationen von mehr als 10 mg/ml wird die Biuret - Methode (2) nach vorheriger Trichloressigsäurefällung (10 %ig) eingesetzt. Bei Lösungen mit einem geringeren Proteingehalt erfolgt die Bestimmung nach der Methode von Lowry et. al. (3). Eine Rinderserumalbuminlösung dient in beiden Fällen als Standard.

2.2.2. Polyacrylamidelektrophorese

Die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese wird nach der Vorschrift von Maurer (4) ausgeführt. Das Sammelgel ist 3,1 %ig an Acrylamid/Bisacrylamid und hat einen pH - Wert von 6,7, das Trenngel ist 7,5 %ig und hat einen pH - Wert von 8,9. Als Elektrodenpuffer verwendet man einen 0,1 M Tris-Glycin-Puffer, pH 8,6. Um die Laufstrecke zu markieren, wird Bromphenolblau den Proteinproben zugesetzt. Die Stromstärke beträgt 5 mA pro Gelröhrchen.

2.2.3. Färbemethoden von Polyacrylamidgelen

2.2.3.1. Proteinfärbung

Die Färbung der Proteinbanden in den Gelen erfolgt mit einer 0,2 %igen Lösung von Coomassie Brilliant Blue R 250 in Methanol : Wasser : Eisessig im Verhältnis 50 : 50 : 10 für 30 min bei Raumtemperatur. Die Entfärbung geschieht mit einer Lösung aus Methanol : Wasser : Eisessig im Verhältnis 50 : 50 : 7. Bei Raumtemperatur und mehrfachem

Wechsel der Entfärbelösung dauert der Vorgang etwa 24 h.

2.2.3.2. Nachweis der Alanin Dehydrogenase Aktivität in Polyacrylamidgelen

Die Aktivitätsfärbung der Alanin Dehydrogenase in Polyacrylamidgelen beruht auf einer Vorschrift zur Färbung von Oxidoreduktasen (5). Die Methode setzt voraus, daß das Enzym im Gel reaktiviert wird und die Reaktion in Richtung der oxidativen Deaminierung abläuft. Reduzierende Substanzen, z.B. 2-Mercaptoäthanol, und Licht stören die Anfärbung.

Das Enzym wird nach der Elektrophorese reaktiviert, indem die Gele in 0,05 M Phosphat-Puffer, 4,3 M NaCl, 10 mM 2-Mercaptoäthanol, pH 7,8 für 5 h bei Raumtemperatur eingelegt werden (6). Danach wird für 2 h gegen einen 0,05 M Tris/HCl-Puffer, 3,5 M KCl, pH 9,0 dialysiert. In Gegenwart von K^+ in entsprechender Konzentration katalysiert die Alanin Dehydrogenase die oxidative Deaminierung. Anschließend wird das Gel für 1,5 h unter Ausschluß von Licht in den Färbeansatz gelegt:

2,5 mg Tetranitroblautetrazolium
0,25 mg Phenazinmethosulfonat
10 mg NAD^+
5,0 mg Alanin
mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer, 3,5 M KCl, pH 9,0
ad 10,0 ml.

Die Färbelösung wird durch Spülen der Gele in Wasser entfernt. Die Lagerung der fertigen Gele erfolgt wegen der höheren Stabilität in 7,5 %iger Essigsäure.

Während der Vorbereitungszeit von 7 h bei Raumtemperatur diffundieren die Proteinbanden der Elektrophorese merklich. Die Methode ist aber dann sinnvoll, wenn bei Elektrophoresen hochangereinigter Proben mit wenigen verschiedenen Proteinbanden diejenige der Alanin Dehydrogenase festgelegt werden soll.

Zur Dokumentation werden Polyacrylamidgele nach der Proteinfärbung mit einem Scanner der Firma Beckman, Spectrophotometer, Typ ACTA III, aufgezeichnet.

2.3. Synthesen

2.3.1. Hydroxylapatit

Die Präparation von Hydroxylapatit für die Säulenchromatographie geschieht nach der Vorschrift von Levin (8).

2.3.2. Hydrophobes Gel

2.3.2.1. Synthese

Zur Synthese hydrophober Gele wird ein Alkylamin an Sepharose 4B nach der Vorschrift von Jennissen und Heilmeyer (9) gekoppelt. Die Aktivierung der Sepharose erfolgt durch Zugabe einer frisch angesetzten Lösung von BrCN in wasserfreiem Dioxan zu einem Ansatz entsprechend folgendem Verhältnis:

25 g abgenutschte Sepharose 4B

24 ml 2,5 M Kaliumphosphatpuffer, pH 12,0

20 ml - x ml Dioxan

x ml BrCN-Dioxan Lösung

Die Aktivierung dauert unter ständigem Rühren bei 8 - 10 °C 12 min. Anschließend wird der Ansatz auf einer G3 - Fritte

schnell abgesaugt und mit dem 10fachen Volumen an eiskaltem 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 9,5, gewaschen. Das aktivierte Gel wird dann sofort in eine 2,0 M Alkylamin/HCl - - Lösung, pH 9,5, eingerührt. Bei Raumtemperatur dauert die Kopplung 3 h.

2.3.2.2. Bestimmung der gebundenen Alkylaminreste

Die Kopplung von Alkylamin an Sepharose 4B nach der BrCN - Methode liefert als Hauptprodukt N-substituierte Isoharnstoffe (10, 11). Die Menge an gebundenem Isoharnstoff pro Einheit gequollenen Produktes wird quantitativ nach der Methode von Werber (12) bestimmt. Als Farbreagenz verwendet man p - Nitrophenolacetat. In einer nukleophilen Reaktion spaltet Isoharnstoff den Ester, das freigesetzte p - Nitrophenolat kann direkt bei $\lambda = 405$ nm spektralphotometrisch gemessen werden.

2.4. Messung der Enzymaktivität

Wie aus der Umsatzgleichung (1) ersichtlich:

(1) $Pyr + NADH + NH_3/NH_4^+ \rightleftharpoons Ala + NAD^+ + H_2O$

kann die Aktivität der Alanin Dehydrogenase sowohl für die reduktive Aminierungsreaktion von Pyruvat als auch für die oxidative Deaminierungsreaktion von Alanin bestimmt werden. Als Meßgrundlage dient der optische Test nach Warburg. Allerdings ist die Maximalgeschwindigkeit der reduktiven Aminierungsreaktion unter gleichen Bedingungen etwa um den Faktor 10 größer als die der oxidativen Deaminierungsreaktion. Bei der Aufarbeitung wird die Enzymaktivität mit der empfindlicheren Aminierungsreaktion gemessen. Dabei

werden Glasküvetten der Schichtdicke d = 1,000 cm bei einer Temperatur von 37 °C verwendet. Das Gesamtvolumen des Meßansatzes beträgt 3,0 ml. Als Meßgerät wird ein Eppendorf - Photometer mit Schreiber und temperiertem Küvettenhalter benutzt. Bei einer Wellenlänge von λ = 366 nm beträgt der molare Extinktionskoeffizient von NADH ε = 3300 l/mol x cm.

Die Konzentrationen des Meßansatzes (6):

3,5 M NaCl

0,04 M Tris/HCl-Puffer, pH 9,0

0,014 M Na-Pyruvat

0,15 M NH_4Cl

0,0004 M NADH

Der Start erfolgt durch Zugabe von Ammoniumchlorid zum fertig gemischten Ansatz. Als Aktivitätseinheit (1 Unit, U) wird diejenige Menge an Enzym festgelegt, die in einer Minute 1 x 10^{-6} mol NADH unter Testbedingungen oxidiert.

2.5. Methoden der Enzymreinigung

Bei der Gewinnung der Alanin Dehydrogenase wird besonders darauf geachtet, daß das Enzym bei möglichst allen Schritten im aktiven Zustand verbleibt. Alle verwendeten Puffer haben daher Kochsalzkonzentrationen von mindestens 2 M.

Damit ist die Auswahl unter den Methoden der klassischen Proteinreinigung eingeschränkt. Verfahren, die nach dem Ionenaustauscherprinzip arbeiten, können nicht angewendet werden.

Die Eignung einer Chromatographiemethode für die Reinigung des halophilen Enzyms wird danach beurteilt, ob es unter geeigneten Bedingungen an das Trägermaterial absor-

biert wird und durch die Wahl eines entsprechenden Puffers wieder eluiert werden kann. Für die Alanin Dehydrogenase ist kein hinreichend affines Substrat oder Analogon bekannt, das eine Verwendung bei der Affinitätschromatographie gestattet.

In der Reinigung des Enzyms werden nacheinander folgende Verfahren eingesetzt:

a) Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung
b) Batchverfahren und Chromatographie an Sepharose 4B und DE52 - Cellulose
c) Chromatographie an Hydroxylapatit
d) Hydrophobe Chromatographie an Octylamin-Sepharose 4B

Das Batchverfahren und die beiden Chromatographien an Sepharose und Cellulose beruhen auf dem Aussalzeffekt (16, 17). In Gegenwart von Ammoniumsulfatkonzentrationen, die fast zur Ausfällung eines Proteins führen, absorbiert es schon an Sepharose und ähnliche Cromatographiematerialien. Das Verfahren wird zu Beginn der Aufarbeitung in zwei Variationen eingesetzt, da es sich durch hohe Kapazitäten auszeichnet. Damit läßt sich ein Konzentrierungs- und Dialyseschritt nach der Ammoniumsulfatfällung umgehen.

2.6. Herkunft der verwendeten Reagenzien

BOEHRINGER Mannheim:

NADH , NAD^+

NADPH, $NADP^+$

P-L-BIOCHEMICALS, Milwaukee, USA:

ε-NAD^+

8-(6-Aminohexyl)-Amino-Nikotinamid-Adenindinu-

cleotid, Natriumsalz

8-(6-Aminohexyl)-Amino-Adenin-5'-Diphosphat

DIFCO - LABORATORIES, Detroit, USA:

Bacto-Tryptone

OXOID Ltd, London, England:

Yeast Extract

PHARMACIA FINE CHEMICALS AB., Uppsala, Schweden:

Dextranblau

Sepharose 4B

ALDRICH-EUROPE, Nettetal:

Hydroxypyruvat

2-Oxobutyrat

2-Oxovaleriansäure

Glyoxalsäure

D- und L-Apfelsäure

WHATMAN Ltd., Springfield Mill, Kent, England:

DE 52 - Cellulose

E.MERCK, Darmstadt:

Alle übrigen Chemikalien.

3. Ergebnisse

3.1. Synthese der Octylamin-Sepharose 4B

Die Auswahl des für die Reinigung der Alanin Dehydrogenase geeigneten Gels erfolgt unter dem Gesichtspunkt, daß das Enzym aus Puffern, die 4,3 M NaCl enthalten, absorbiert wird und mit Puffern, die mindestens 2,0 M NaCl enthalten, eluiert werden kann. Bei diesen Salzkonzentrationen bleibt die Aktivität zu 100% erhalten.

Mit der Kettenlänge der Alkylreste (13, 14) und ihrer

Konzentration pro ml Gel (15) kann man die Affinität und die Kapazität eines hydrophoben Gels verändern. Dabei führt die Erhöhung der BrCN - Konzentration im Aktivierungsansatz zu größeren Konzentrationen an gekoppeltem Alkylamin pro ml Gel.

Alle Versuche mit hydrophoben Gelen, die durch Kopplung von Butyl- bzw. Hexylamin nach der BrCN-Methode erhalten wurden, das Enzym aus 4,3 M NaCl haltigen Lösungen zu absorbieren, schlugen fehl. Die Absorption gelingt mit Octylamin-Sepharose. Für die Aufarbeitung wird ein hydrophobes Gel verwendet, das bei einer BrCN - Konzentration von 3,5 mg/ml Aktivierungsansatz synthetisiert wird. Der Octylaminrestgehalt beträgt 5 µmol/ml Gel.

3.2. Reinigung der Alanin Dehydrogenase

3.2.1. Liste der bei der Aufarbeitung verwendeten Puffer

Puffer A : 0,05 M KPO_4-Puffer
4,3 M NaCl, pH 7,8

Puffer B : 0,05 M KPO_4-Puffer
5,0 M NaCl, pH 7,8

Puffer C : 0,05 M KPO_4-Puffer
2,0 M NaCl, pH 7,8

Puffer D : 0,20 M KPO_4-Puffer
4,3 M NaCl, pH 7,8

Die Puffer A bis D enthalten 1 mM 2-Mercaptoäthanol, die Puffer E und F dagegen kein 2-Mercaptoäthanol.

Puffer E : 80 Vol% gesättigte Ammoniumsulfatlösung, mit NH_4OH auf pH 7,8 eingestellt

20 Vol% Puffer A

Puffer F : 60 Vol% gesättigte Ammoniumsulfatlösung, mit NH_4OH auf pH 7,8 eingestellt

40 Vol% Puffer A

3.2.2. Reinigung

3.2.2.1. Gewinnung des Rohextraktes

31 g Bakterien (Feuchtgewicht) werden in 200 ml Puffer A aufgeschlämmt und in einem Glasgefäß im Eisbad für 5 min beschallt (70 Watt). Danach wird für 30 min abzentrifugiert (20 000 x g, 4 °C), das Sediment wird verworfen.

3.2.2.2. Ammoniumsulfatfällung

Der Rohextrakt wird mit kaltem Puffer A solange verdünnt, bis die Proteinkonzentration bei etwa 10 mg/ml liegt. (6). Bei 4 °C wird langsam unter Rühren das berechnete Volumen an kalt gesättigter Ammoniumsulfatlösung zugesetzt und anschließend für 4 h gerührt. Nach der Zentrifugation (20 000 x g, 4 °C, 60 min) befindet sich die Aktivität im Überstand. Alle weiteren Schritte der Aufarbeitung erfolgen bei Raumtemperatur.

3.2.2.3. Batchverfahren an Sepharose 4B

Bei Raumtemperatur wird portionsweise Sepharose 4B in den Überstand der Ammoniumsulfatfällung eingerührt, die mit Puffer E äquilibriert worden ist. Die Prüfung auf Vollständigkeit der Absorption erfolgt durch Messen der Enzymaktivität im Filtrat kleiner Proben. Es wird solange unter

Rühren Sepharose zugesetzt, bis keine Aktivität mehr im Filtrat der Proben gefunden wird. Die Aufschlämmung wird bei schwachem Wasserstrahlvakuum abgenutscht (Glasfritte G 3). Das braune Gel wird mehrfach mit je 100 ml Puffer E gewaschen, die Filtrate werden verworfen.

3.2.2.4. Chromatographie an Sepharose 4B

Das im Batchverfahren beladene Gel wird in wenig Puffer E aufgenommen und damit das Gelbett einer Säule (40 x 5 cm) überschichtet, die mit Puffer E äquilibriete Sepharose 4B enthält. Nachdem der Puffer abgelaufen ist, wird das Säulenmaterial mit Puffer A überschichtet und die Chromatographie mit diesem Puffer ausgeführt. Fraktionen von 15 ml werden gesammelt. Alle Enzymaktivität enthaltenden Fraktionen werden gesammelt.

3.2.2.5. Chromatographie an DE 52 - Cellulose

Durch Zugabe des berechneten Volumens an 100 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung, pH 7,8, wird die Enzymlösung von 3.2.2.4. auf 60 % Ammoniumsulfatsättigung eingestellt und auf eine DE 52 - Cellulose-Säule aufgetragen (30 x 2,5 cm). Das Gelmaterial ist mit Puffer F äquilibriert. Die Chromatographie wird durch einen Gradienten aus je 500 g[1)] Puffer F im Mischer- und 500 g Puffer A im Vorratsgefäß entwickelt. Abbildung 1 zeigt das Elutionsprofil. Alle Fraktionen, die Aktivität enthalten, werden gesammelt.

[1)] Wegen der unterschiedlichen spezifischen Gewichte werden die Puffervolumina der Gradienten ausgewogen.

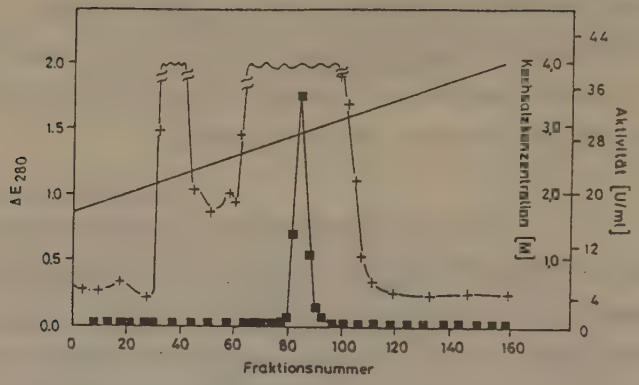


Abb.1 Chromatographie an DE-52 Cellulose

Fraktionen von je 5 ml werden gesammelt.
—+—Absorption bei λ = 280 nm
—■—Aktivität der Alanin Dehydrogenase
——Verlauf des Gradienten von NaCl, der entgegengesetzt verlaufende NH_4Cl - Gradient ist nicht eingezeichnet.

3.2.2.6. Hydroxylapatitchromatographie

Die Fraktionen der Aussalzchromatographie an DE 52 - Cellulose, die die Alanin Dehydrogenase Aktivität enthalten, werden - bei dreimaligem Wechsel des Außenpuffers - gegen Puffer A dialysiert und auf eine mit Puffer A äquilibrierte Hydroxylapatit-Säule (25 x 2,5 cm) aufgetragen. Die Säule wird mit 200 ml Puffer A gewaschen. Die Chromatographie erfolgt mittels eines Gradienten aus je 450 g Puffer A im Mischer- und 450 g Puffer D im Vorratsgefäß. Abbildung 2 zeigt das Elutionsdiagramm.

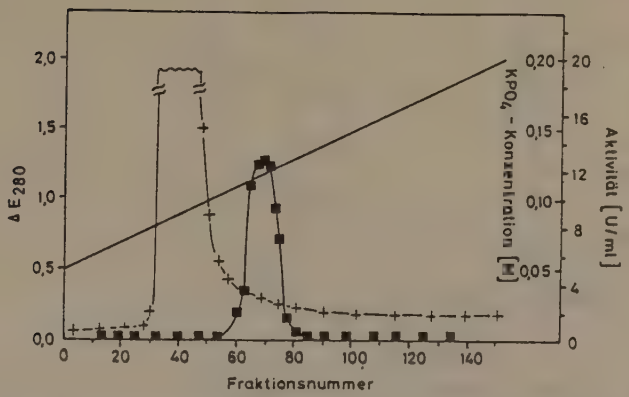


Abb. 2 Hydroxylapatitchromatographie

Fraktionen mit je 5 ml werden gesammelt.
—+—Absorption bei λ = 280 nm
—■—Aktivität der Alanin Dehydrogenase
———Verlauf des KPO_4- Gradienten

3.2.2.7. Hydrophobe Chromatographie

Alle Aktivität enthaltenden Fraktionen der Chromatographie an Hydroxylapatit werden gepoolt und solange portionsweise mit festem NaCl versetzt, bis die Kochsalzkonzentration 5,0 M beträgt.

Diese Lösung wird auf eine Säule (20 x 2,5 cm) mit mit Puffer B äquilibrierter Octylamin-Sepharose 4B aufgetragen und mit einem Gradienten aus je 300 g Puffer B im Mischer- und 300 g Puffer C im Vorratsgefäß entwickelt. Die Abbildung 3 zeigt das Elutionsprofil.

Von einer Probe des Enzympeaks der hydrophoben Chromatographie wird eine Polyacrylamidgelelektrophorese gemacht.

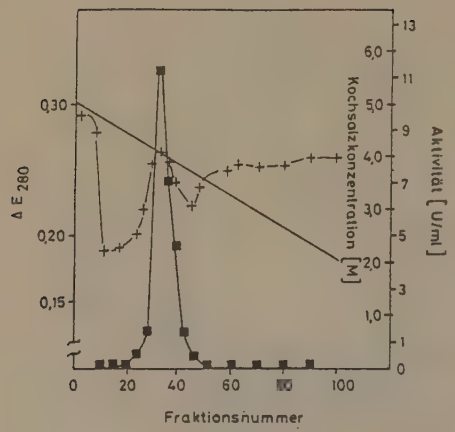


Abb. 3 Hydrophobe Chromatographie

Das Fraktionsvolumen beträgt 5 ml.
—┼—Absorption bei λ = 280 nm
—■—Aktivität der Alanin Dehydrogenase
—— Verlauf des Kochsalzgradienten

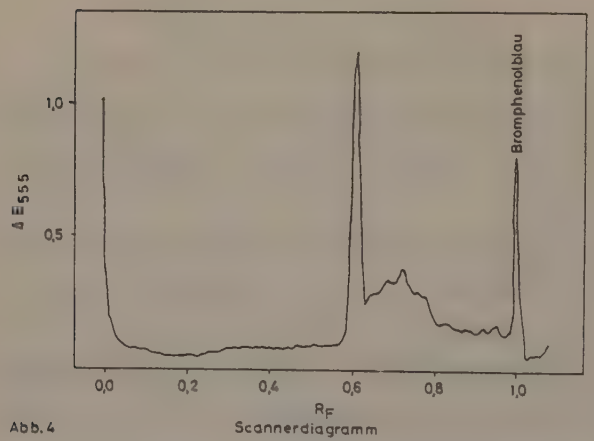


Abb. 4

Scannerdiagramm eines Coomassie Blue gefärbten Polyacrylamidgels. (7,5 %iges Trenngel, Probe: 100 ug Protein mit einer spezifischen Aktivität von 69,5 U/mg)

Tabelle 1: Bilanz der Aufarbeitung

Schritt	Vol [ml]	Gesamt-aktivität [U]	Gesamt-protein [mg]	Spezif. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungs-faktor
Rohextrakt	226	1388	2869	0,48	100	1
Chromatographie an Sepharose 4B	210	1216	223	5,63	87,6	11
Chromatographie an DE52-Cellulose	110	1212	54,9	22,1	87,3	45,9
Chromatographie an Hydroxylapatit	129	860	25,9	33,3	61,9	69,2
Hydrophobe Chromatographie	134	591,6	8,51	69,44	43,0	139,8

Abbildung 4 zeigt das Scannerbild bei Anfärbung auf Proteine. Die Aktivitätsanfärbung ergibt nur eine Bande mit dem R_F-Wert der Hauptbande des Coomassie gefärbten Gels.

Die Ergebnisse der Aufarbeitung sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

3.3. Kinetische Untersuchungen

Die Reaktion der Alanin Dehydrogenase stellt ein komplexes System dar:

(1) $Pyr + NADH + NH_3/NH_4^+ \rightleftharpoons Ala + NAD^+ + H_2O$

Die Wahl des geeigneten Puffers im Meßansatz erlaubt es, den pH - Wert während der ersten Minuten nach dem Start der Reaktion hinreichend konstant zu halten. Unter diesen Bedingungen kann die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration vernachlässigt werden.

Das pH - Optimum der Reaktion liegt bei 9,0 (6). Der pK - Wert von Ammonium liegt bei 9,25. Ein erheblicher Teil des dem Reaktionsansatz zugesetzten Ammoniumchlorids liegt deshalb in Lösung als Ammoniak vor.

Gibt man aber zu allen Meßansätzen dieselbe Menge an NH_4Cl und startet die Reaktion, nachdem die Küvette für 20 min bei 37 °C im Küvettenhalter temperiert worden ist, so liegt in allen Ansätzen dieselbe Konzentration an Ammoniumionen bzw. Ammoniak vor. Die Reaktionsgleichung lautet demnach nur noch (2) :

(2) $Pyr + NADH \rightleftharpoons Ala + NAD^+$

Das bedeutet: formal liegt dann eine Zwei - Substrat - - Reaktion vor.

Die Reversibilität der Reaktion ist abhängig von der Art der im Ansatz vorhandenen Alkaliionen. In Gegenwart von 3,0 M KCl läuft sowohl die reduktive Aminierung als auch die oxidative Deaminierung ab. In Puffern mit 3,5 M NaCl kann aber nur die reduktive Deaminierung gemessen werden (7).

Alle kinetischen Untersuchungen dieser Arbeit beruhen auf der Messung der Anfangsgeschwindigkeit. Die Salzkonzentrationen der Ansätze werden auf 3,5 M NaCl bzw. 3,25 M KCl festgelegt. Die Pufferkonzentration beträgt 100 mM Tris/HCl, pH 9,0. Werden Substrate als Säuren eingesetzt, so wird der pH - Wert vorher auf 9,0 eingestellt.
Eine Ausnahme hiervon bildet die Säure NAD^+. In schwach alkalischen Lösungen zerfällt NAD^+ meßbar unter Bildung eines gelben Produktes (18). Messungen in Gegenwart von hohen Konzentrationen an NAD^+ sind deshalb mit einem größeren Fehler behaftet, da dann der pH - Wert des Reaktionsansatzes leicht ins Saure verschoben ist.

Die Messung wird durch Zugabe von 10 µl Enzymlösung zum temperierten Ansatz gestartet. Pro Küvette werden je nach Konzentration des Enzyms Aktivitäten von 0,052 bis 0,204 U eingesetzt. Bei einer spezifischen Aktivität von 69,5 U/mg enthalten die Meßansätze damit zwischen 0,7 und 2,9 µg Protein.

Bei der Wahl des Variationsbereiches der Substrate wird darauf geachtet, daß keine Konzentrationen von mehr

als 70 mM für Pyruvat und 50 mM für Alanin vorliegen. Bei höheren Konzentrationen tritt Substrathemmung auf. Bei den Cofaktoren konnte keine Subatrathemmung beobachtet werden. (Abb. 5)

3.3.1. Bestimmung der kinetischen Konstanten

Für die Bestimmung der kinetischen Konstanten wird die Anfangsgeschwindigkeit entsprechend 2.4. gemessen.

Geht man von der Gültigkeit des Modells der Zwei - - Substrat - Reaktion aus, so gilt die allgemeine Geschwindigkeitsgleichung nach Alberty (19) in der Schreibweise nach Laidler & Buntig (20) (3):

$$(3)\quad v = \frac{V_1 [A][B]}{K'_A K_B + K_B[A] + K_A[B] + [A][B]}$$

wobei v bzw. V_1 gemessene Anfangs- bzw. maximale Geschwindigkeit bedeuten, K_A und K_B die kinetischen Konstanten der Substrate bzw. Cofaktoren A und B und $[A]$ und $[B]$ deren Konzentrationen bedeuten. K'_A ist die Dissoziationskonstante des Enzymsubstratkomplexes.

Die Auswertungen der experimentellen Daten der Messungen geschieht nach der Methode von Lineweaver & Burk (21). Man trägt die reziproke Anfangsgeschwindigkeit, $\frac{1}{v}$, gegen die reziproke Konzentration des variierten Substrates A, $1/[A]$, auf, während die Konzentration des zweiten Substrates $[B]$ konstant gehalten wird.

Die reziproke Form der allgemeinen Geschwindigkeitsgleichung lautet (4):

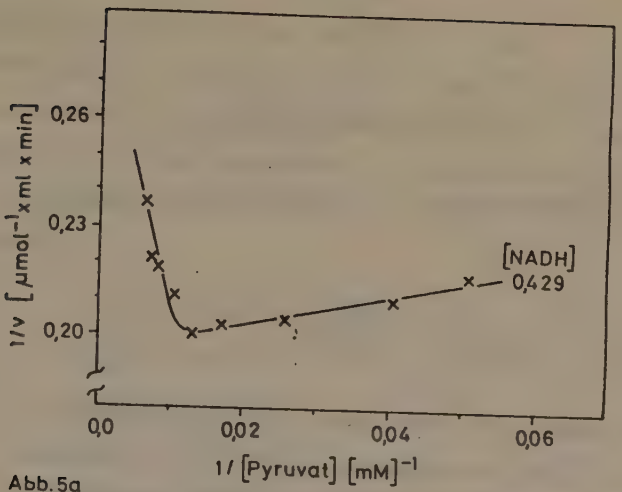


Abb.5a

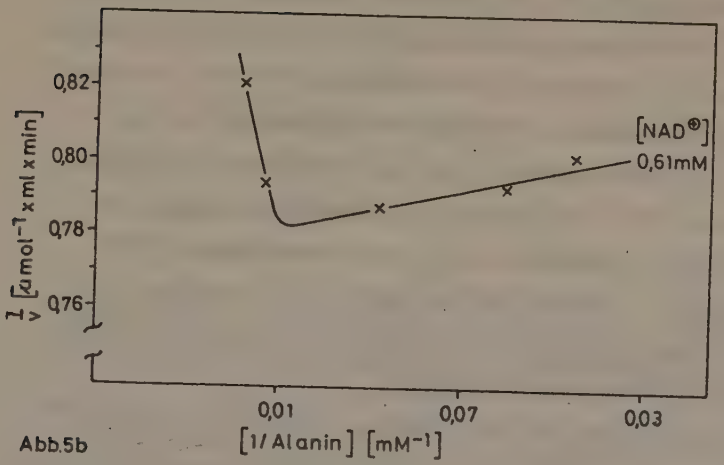


Abb.5b

Abb.5a: Doppelt reziproke Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der reduktiven Aminierung gegen die Konzentration des Substrates Pyruvat. Die NADH-Konzentration ist in der Abbildung vermerkt.

Abb.5b: Doppelt reziproke Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der oxidativen Deaminierung von Alanin gegen die Konzentration von Alanin. Die NAD^+-Konzentration ist in der Abbildung vermerkt.

$$\textcircled{4}\quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_1} + \frac{K_A}{V_1[A]} + \frac{K_B}{V_1[B]} + \frac{K'_A\ K_B}{V_1\,[A][B]}$$

Für fest vorgegebenes B vereinfacht sich Gleichung zu ⑤:

$$\textcircled{5}\quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_1} + \frac{K_B}{V_1[B]} + \left(\frac{K_A}{V_1} + \frac{K'_A K_B}{V_1\,[B]}\right) \cdot \frac{1}{[A]}$$

Die Auftragung der reziproken Anfangsgeschwindigkeit, $\frac{1}{v}$, gegen $1/[A]$ mit konstantem $[B]$ liefert bei Vorliegen einer Zwei - Substrat - Reaktion eine Gerade mit der Geradengleichung ⑤. Die schrittweise Erhöhung der Konzentration von B führt zu einer Schar von Geraden mit kleiner werdendem Achsenabschnitt der Ordinate.

Aus der primären Auftragung nach Lineweaver & Burk können die Ordinatenabschnitte und Steigungen für unterschiedliche Konzentrationen von B abgelesen werden. In sekundären Auftragungen werden diese Werte gegen $1/[B]$ aufgetragen. In beiden Fällen ergeben sich Geraden. Aus deren Ordinatenabschnitten und Steigungen lassen sich die kinetischen Konstanten berechnen.

Die Abbildungen 6a und 6c zeigen jeweils die primären Auftragungen nach Lineweaver & Burk, die in einer Meßreihe für die reduktive Aminierungsreaktion in NaCl haltigem Puffer erhalten wurden.Die eingezeichneten Geraden entsprechen der Ausgleichsgerade, die bei gleicher Wichtung aller Meßpunkte errechnet wurde. Die Konzentrationen des jeweils konstant gehaltenen zweiten Substrates sind an den

Geraden vermerkt. In der Abbildung 6b ist Auftragung der Ordinatenabschnitte bzw. Steigungen des primären Plots gegen die Konzentration von Pyruvat dargestellt. Aus den zugehörigen Geradengleichungen lassen sich folgende Werte für die kinetischen Konstanten berechnen:

V_1 = 4,26 µmol/ml x min
K_{Pyr} = 0,843 mM
K_{NADH} = 0,036 mM
K'_A = 0,164 mM

Abbildung 6d zeigt die sekundäre Auftragung der abgelesenen Werte aus Abbildung 6c. Aus den Ausgleichsgeradengleichungen von 6d lassen sich folgende Werte der kinetischen Konstanten berechnen:

V_1 = 4,33 µmol/ml x min
K_{Pyr} = 1,18 mM
K_{NADH} = 0,0381 mM
K'_A = 0,0995 mM

In Tabelle 2 sind die kinetischen Konstanten der Alanin Dehydrogenase für alle Substrate und Cofaktoren zusammengestellt.

Da bei der Bestimmung der kinetischen Konstanten stets lineare Auftragungen erhalten wurden, kann an dieser Stelle folgende Aussage bezüglich des Mechanismus der Alanin Dehydrogenase gemacht werden: Die vereinfachte Reaktionsgleichung (2) des Enzyms ist anwendbar. Da für beide Richtungen eine Dissoziationskonstante $K'_A \neq 0$

gefunden wurde, kann schon jetzt das Vorliegen eines ping - - pong - Mechanismus ausgeschlossen werden. In diesem Fall nämlich sollte für die Dissoziationskonstante gelten: $K'_A = 0$. Die Reaktion der Alanin Dehydrogenase erfolgt also nach einem sequentiellen Mechanismus. Anhand kinetischer Untersuchungen allein mit Substraten und Cofaktoren kann jedoch keine Aussage über die Art des sequentiellen Mechanismus gemacht werden.

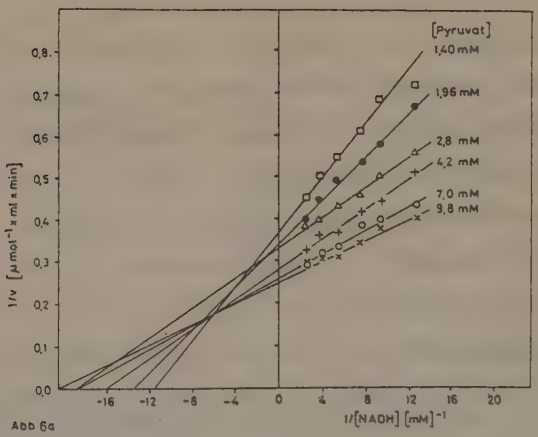


Abb. 6a: Doppelt reziproke Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Konzentration von NADH. Es wird die reduktive Aminierung von Pyruvat in Gegenwart von 3,5 M NaCl, pH 9,0 bei 37 °C gemessen. Jede Gerade wird für eine konstante Konzentration an Pyruvat ermittelt, die in der Abbildung an den Geraden vermerkt worden ist.

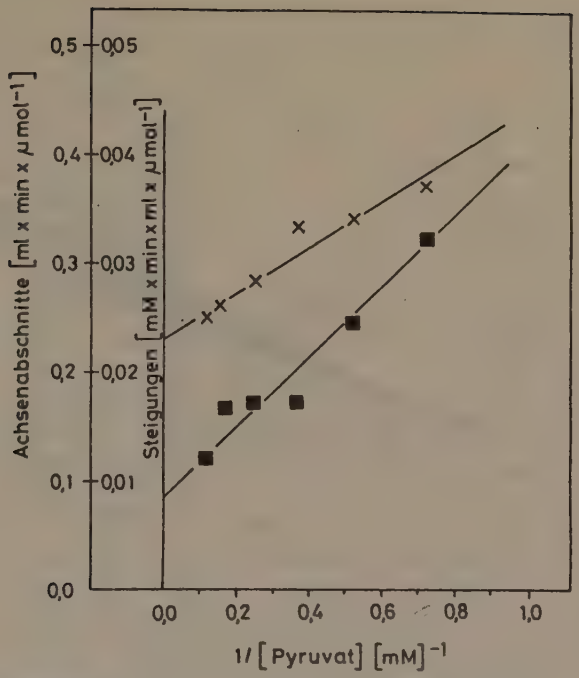


Abb. 6b

Abb.6b: Auftragung der Achsenabschnitte bzw. Steigungen der Geraden von Abb. 6a gegen die reziproke Konzentration des zweiten Substrates Pyruvat.

—X—Achsenabschnitte

—■—Steigungen

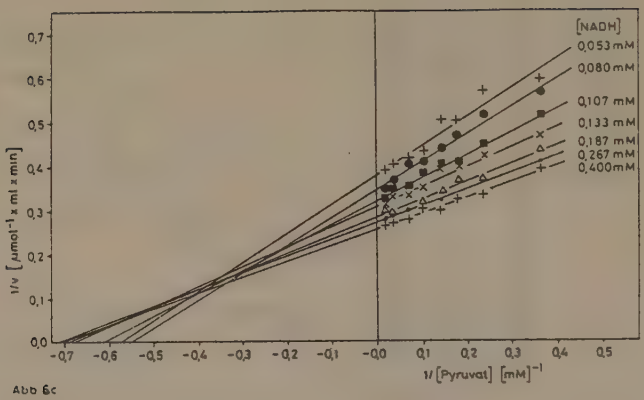


Abb 6c

Abb.6c: Doppelt reziproke Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Konzentration von Pyruvat. Messung der Geschwindigkeit der reduktiven Aminierung von Pyruvat in 3,5 M NaCl, pH 9,0, bei 37 °C. Die jeweils konstant gehaltene Konzentration des zweiten Substrates NADH ist an den Geraden in der Abbildung vermerkt.

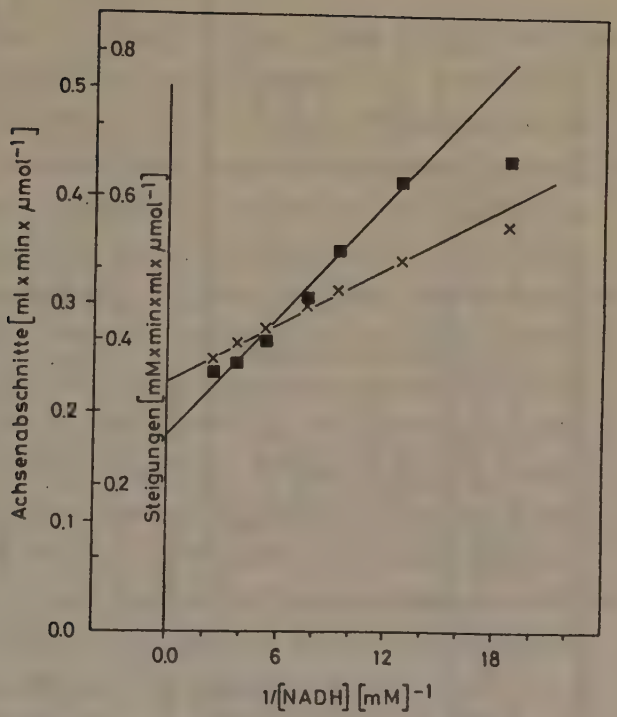


Abb. 6d

Abb.6d: Auftragung der Achsenabschnitte (Ordinatenabschnitte) bzw. Steigungen der Geraden von Abb. 6c gegen die reziproke Konzentration des zweiten Substrates NADH.

—X—Achsenabschnitte

—■—Steigungen

Tabelle 2: Kinetische Konstanten der Alanin Dehydrogenase bei pH 9,0 und 37 °C

Reaktionsrichtung	Salz	K_{Pyr} [mM]	K_{Ala} [mM]	K_{NADH} [mM]	K_{NAD^+} [mM]	K'_A [mM]
Reduktive Aminierung von Pyruvat	NaCl	0,956 ±0,018	----	0,0366 ± 0,0014	----	0,183 ± 0,087
	KCl	0,676 ±0,034	----	0,0128 ± 0,0039	----	0,0588 ±0,0242
Oxidative Deaminierung von Alanin	NaCl	Keine Reaktion meßbar				
	KCl	----	4,02 ± 2,33	----	0,862 ± 0,33	2,71 ± 2,07

3.3.2. Produkthemmung

Eine Analyse der Reaktion kann durch die Untersuchung des kinetischen Verhaltens in Gegenwart von Hemmstoffen erfolgen. Insbesondere erhält man dann Aussagen, wenn die Hemmstoffe analoge Strukturen zu den eingesetzten Substraten und Cofaktoren besitzen. Das ist gerade dann der Fall, wenn man kinetische Studien in Gegenwart von Produkten der Reaktion betreibt. Cleland (22) hat Produkthemmschemata entwickelt, die bei Vorliegen verschiedener Mechanismen des sequentiellen Typs beobachtet werden. Er bezieht sich dabei nur auf die klassischen drei Hemmtypen, nämlich kompetitive, nicht kompetitive und unkompetitive Hemmung. Die Bestimmung des Hemmtyps einer Zwei - Substrat - Reaktion kann mit Hilfe der Auftragung nach Lineweaver und Burk durch Auftragen der reziproken Anfangsgeschwindigkeit gegen die reziproke Konzentration des variierten Substrates erfolgen. Während die Konzentration des zweiten Substrates konstant gehalten wird, ändert man die des Hemmstoffes schrittweise. Man erhält dann eine Schar von Geraden, aus der man theoretisch den Hemmtyp ablesen kann. Untersucht man jedoch eine sehr schwach hemmende Substanz, ist es unter Umständen nicht immer möglich, das experimentelle Ergebnis dem einen oder anderen Hemmtyp zuzuordnen.

Bei der Auswertung von Meßergebnissen verfährt man deshalb so, daß man der primären Auftragung die Werte der Achsenabschnitte und Steigungen der einzelnen Geraden für verschiedene Hemmstoffkonzentrationen entnimmt. In einem sekundären Plot werden diese dann gegen die Konzen-

tration des Hemmstoffs aufgetragen. Erhält man dabei Geraden, so liegt ein klassischer Hemmtyp vor. Erweisen sich die Achsenabschnitte des primären Plots als unabhängig von der Hemmstoffkonzentration, d.h. erhält man aus den Werten in der sekundären Auftragung eine Gerade mit der Steigung 0, so liegt eine kompetitive Hemmung vor. Bei einer unkompetitiven Hemmung sind die Steigungen der Geraden der Auftragung nach Lineweaver und Burk unabhängig von der Hemmstoffkonzentration. Liegt schließlich ein nicht kompetitiver Hemmtyp vor, so sind sowohl die Ordinatenabschnitte als auch die Steigungen der Geraden der primären Auftragung direkt proportional zur Konzentration des Hemmstoffes.

Bei der Untersuchung des Mechanismus der Reaktion der Alanin Dehydrogenase mittels der Produkthemmung muß zwischen der reduktiven Aminierungsreaktion und der oxidativen Deaminierungsreaktion unterschieden werden. Erstere wird in Gegenwart von 3,5 M NaCl, letztere in Gegenwart von 3,25 M KCl gemessen. Außerdem kann das jeweils konstant gehaltene Substrat in einer Konzentration vorliegen, deren Größenordnung der ihres K - Wertes entspricht. Sie ist dann ungesättigt. Nach Plowman (23) liegt das zweite Substrat dann gesättigt im Testansatz vor, wenn dessen Konzentration mindstens um den Faktor 100 mal größer ist als dessen K - Wert. Untersuchungen unter diesen Bedingungen sind in den meisten Fällen aus meßtechnischen oder reaktionstechnischen Gründen nicht möglich. Die nach Plowman gesättigten Konzentrationen von Alanin und Pyruvat liegen im Substrathemmbereich (vergl. Abb. 5).

NAD^+ muß als Säure eingesetzt werden. Bei K_{NAD^+} = 0,862 mM beträgt die nach Plowman gesättigte NAD^+ Konzentration mindestens 86,2 mM im Testansatz, wenn NAD^+ als gesättigtes zweites Substrat eingesetzt werden soll. Eine so große Menge Säure wird vom Testpuffer nicht mehr abgefangen. Um den Meß - pH - Wert von 9,0 zu erhalten, muß die NAD^+ Lösung, die zum Testansatz gegeben werden soll, auf diesen pH eingestellt werden. Das führt aber zu einem augenblicklichen NAD^+ Zerfall, der anhand der Gelbverfärbung der vorher klaren Lösung beobachtet werden kann (18). Die Extinktion steigt während einer Meßreihe so hoch an, daß spektralphotometrische Messungen nicht mehr möglich sind. Die Konzentration von NAD^+ ändert sich durch den Zerfall des Cofaktors im Laufe einer Meßreihe. Dadurch wird ein zusätzlicher systematischer Fehler in das Experiment eingeführt. Aus diesen Gründen werden die Produkthemmversuche nur mit gesättigten Konzentrationen von NADH als zweitem Substrat ausgeführt.

Bei den Versuchen werden folgende Hemmtypen ermittelt:

a) Hemmuntersuchungen in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, 3,5 M NaCl, pH 9,0 für die reduktive Aminierungsreaktion:
Abb. 7 zeigt die primären und sekundären Auftragungen für die Hemmung von NADH durch die Produkte NAD^+ und Alanin. Die Pyruvatkonzentration wird jeweils konstant gehalten. Abb. 8 zeigt die Ergebnisse der Hemmversuche von Pyruvat mit den Produkten NAD^+ und Alanin der Reaktion. Die Konzentration des Cofaktors NADH wird nicht variiert. Sie liegt im Sinne der Plowman Definition nicht im Sättigungsbereich. Für etwa 100 fach höhere NADH Konzentrationen ergeben

sich die Hemmtypen, die in Abb. 9 gezeigt werden.

b) Hemmuntersuchungen in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, 3,5 M NaCl, pH 9,0, für die oxidative Deaminierungsreaktion: Abb. 10 zeigt die Ergebnisse von Hemmversuchen von NAD^+ durch die beiden Produkte der Reaktion, NADH und Pyruvat. Die Auftragungen der Hemmversuche von Alanin durch NADH und Pyruvat sind in Abb. 11 zusammengestellt.

Tabelle 3 faßt alle Ergebnisse der Produkthemmversuche zusammen.

Sie zeigt das Produkthemmschema, das nach Cleland (22) für eine ordered bi-bi-reaction erhalten wird. Laidler und Bunting bezeichnen diesen Typ als ordered ternary--complex mechanism (24).

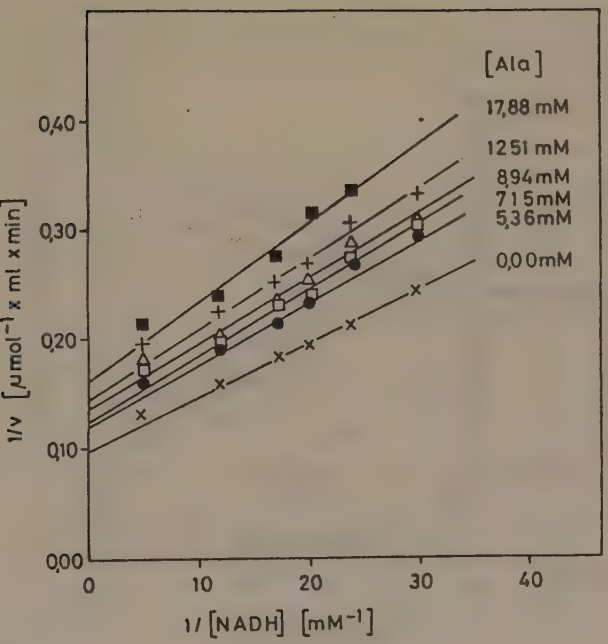


Abb. 7a

Abb.7a: Hemmung von NADH durch Alanin, doppelt reziproke Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der reduktiven Aminierung von Pyruvat gegen die NADH Konzentration bei einer konstanten Pyruvatkonzentration von 2,28 mM. Die verschiedenen Alaninkonzentrationen sind an den Geraden der Abbildung vermerkt.

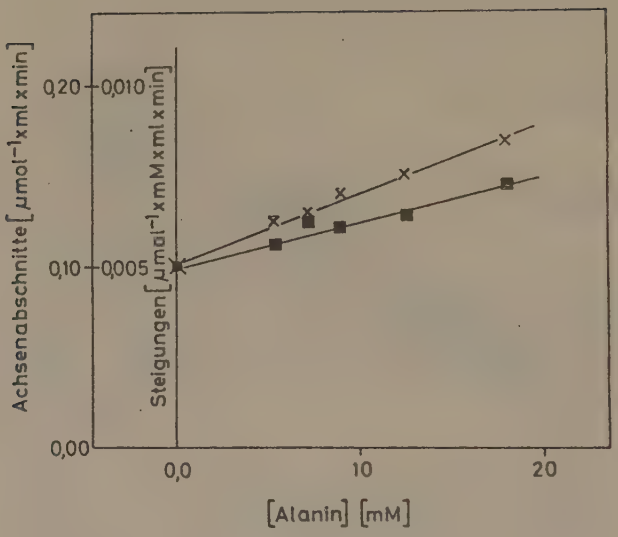


Abb. 7b

Abb.7b: Sekundäre Auftragung der Achsenabschnitte bzw. Steigungen der Geraden von Abb.7a gegen die lineare Konzentration des Hemmstoffs Alanin.
—X—Achsenabschnitte
—■—Steigungen
Die Abbildung zeigt das Bild einer nicht kompetitiven Hemmung.

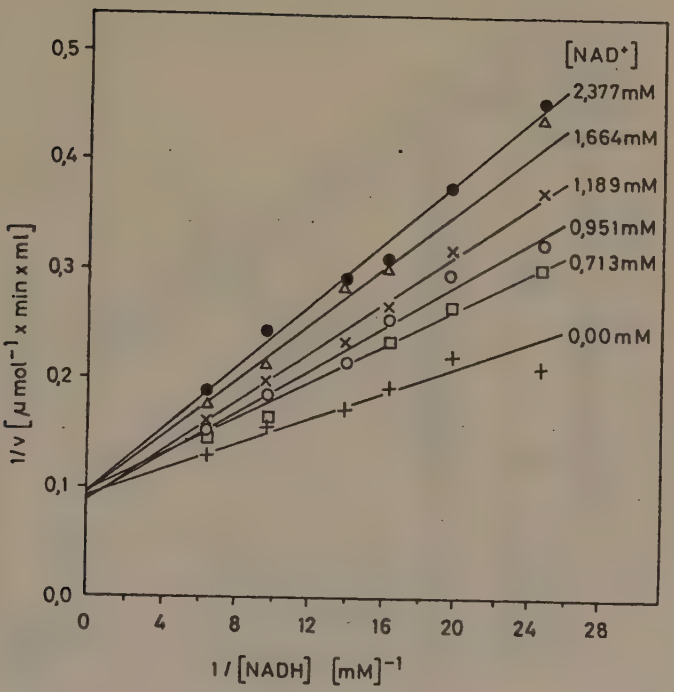


Abb.7c

Abb.7c: Hemmung von NADH durch NAD^+, doppelt reziproke, primäre Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der reduktiven Aminierung von Pyruvat gegen die Konzentration von NADH. Die konstant gehaltene Pyruvatkonzentration beträgt 2,28 mM. Die Konzentrationen des hemmenden Produktes, NAD^+, sind in der Abbildung an den jeweiligen Geraden vermerkt.

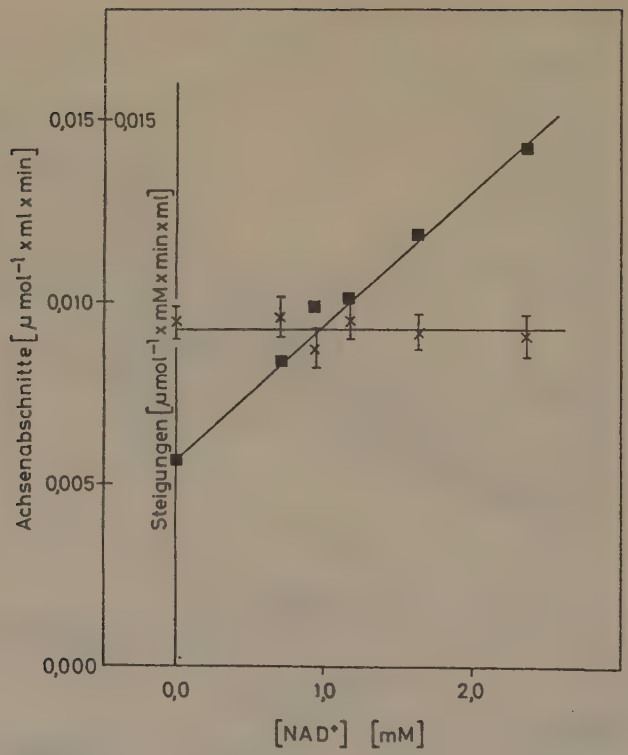


Abb. 7d

Abb.7d: Sekundäre Auftragung der Achsenabschnitte bzw. Steigungen der Geraden von Abb.7c gegen die Konzentration des Hemmstoffs NAD^+.
—X—Achsenabschnitte
—■—Steigungen
Es ergibt sich eine kompetitive Hemmung.

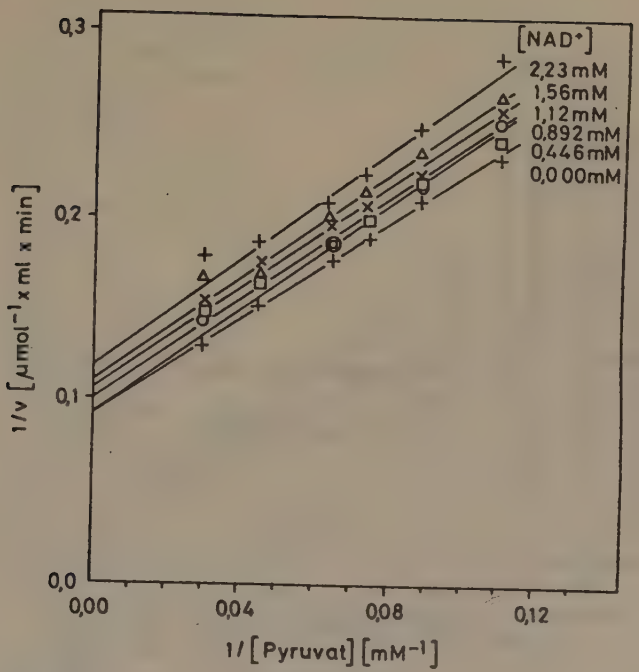


Abb. 8a

Abb.8a: Hemmung von Pyruvat durch NAD^+, doppelt reziproke, primäre Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der reduktiven Aminierung von Pyruvat gegen die Konzentration von Pyruvat bei konstant gehaltener NADH Konzentration von 0,117 mM. Die Konzentration des hemmenden Produktes NAD^+ ist an den zugehörigen Geraden in der Abbildung vermerkt.

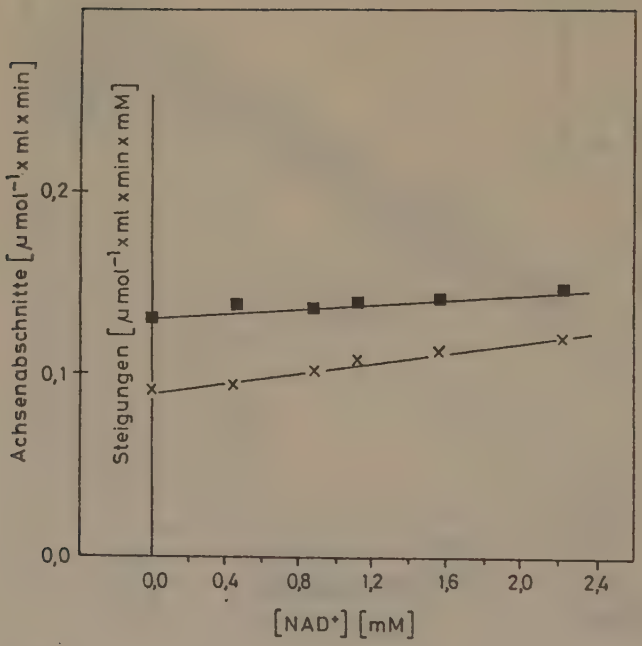


Abb. 8b

Abb.8b: Sekundäre Auftragung der Achsenabschnitte bzw. Steigungen der Geraden von Abb.8a gegen die Konzentration des Hemmstoffs NAD^+.
—X —Achsenabschnitte
—■ —Steigungen
Es ergibt sich eine nicht kompetitive Hemmung.

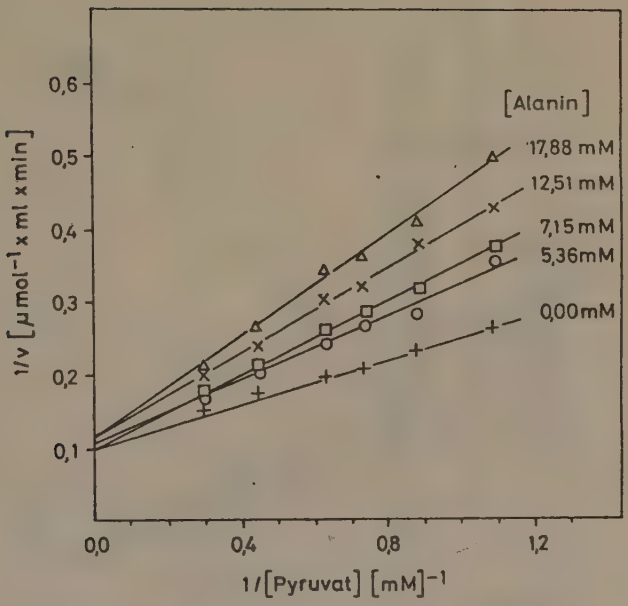


Abb. 8c

Abb.8c: Hemmung von Pyruvat durch Alanin, doppelt reziproke, primäre Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der reduktiven Aminierung von Pyruvat gegen die Konzentration von Pyruvat bei einer konstanten Konzentration von NADH von 0,093 mM. Die jeweilige Konzentration des Hemmstoffes Alanin ist an den zugehörigen Geraden der Abbildung vermerkt.

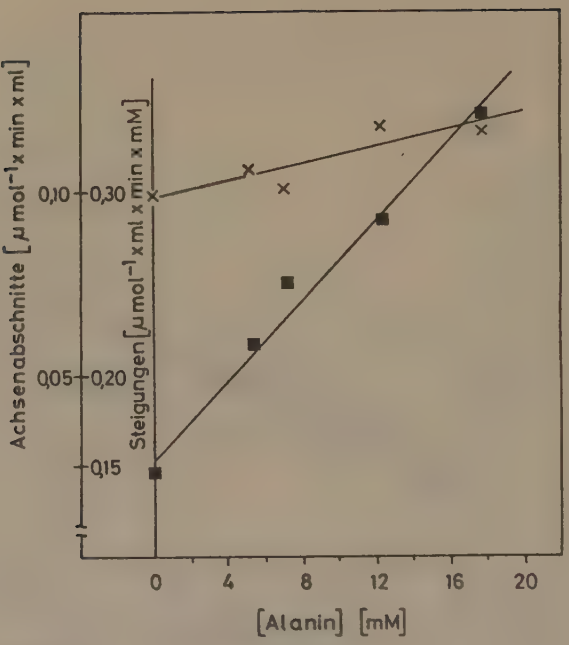


Abb. 8d

Abb.8d: Sekundäre Auftragung der Achsenabschnitte bzw. Steigungen der Geraden der Abb.8c gegen die Konzentration des Hemmstoffs Alanin.
—X—Achsenabschnitte
—■—Steigungen
Aus Abb.8d ergibt sich eine nicht kompetitive Hemmung.

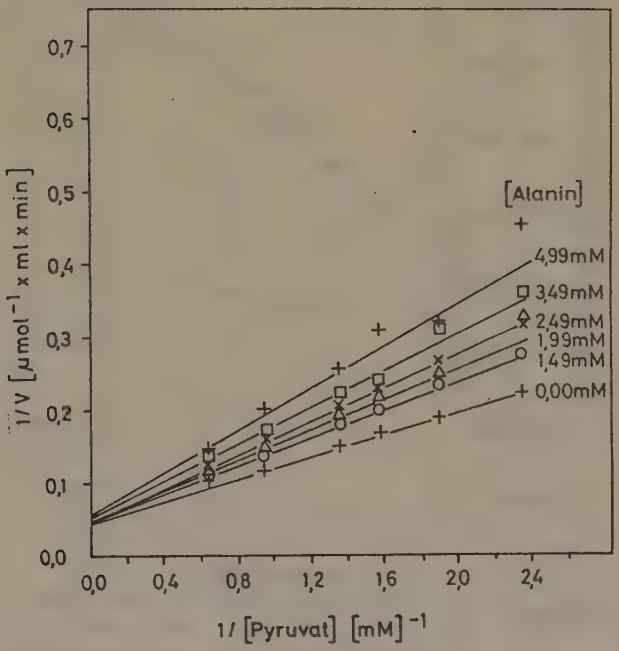


Abb. 9a

Abb.9a: Hemmung von Pyruvat durch Alanin.
Primäre, doppelt reziproke Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der reduktiven Aminierung von Pyruvat gegen die Konzentration von Pyruvat. Die Konzentration des Cofaktors NADH beträgt 1,324 mM, sie ist damit im Sinne der Plowman - Definition gesättigt. Die Konzentrationen des Hemmstoffes Alanin sind an den Geraden der Abbildung vermerkt.

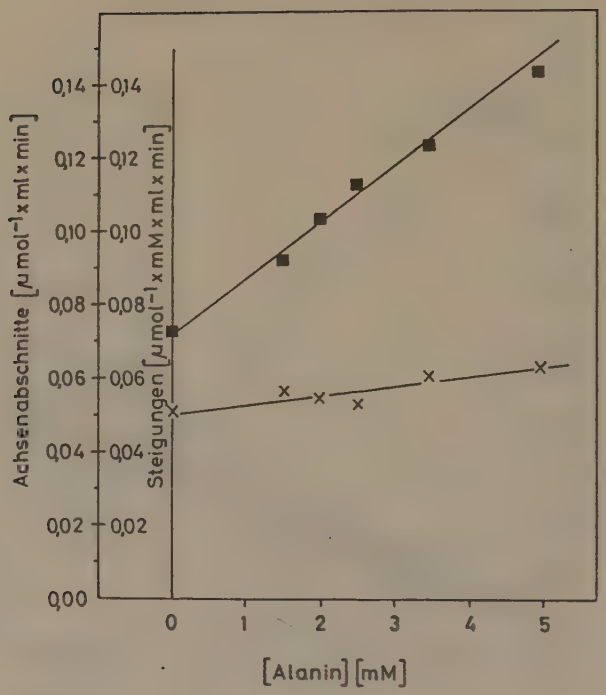


Abb. 9b

Abb.9b: Sekundäre Auftragung der Achsenabschnitte bzw. Steigungen der Geraden der Abb.9a gegen die Konzentration des Hemmstoffs Alanin.
—X—Achsenabschnitte
—■—Steigungen
Es ergibt sich eine nicht kompetitive Hemmung.

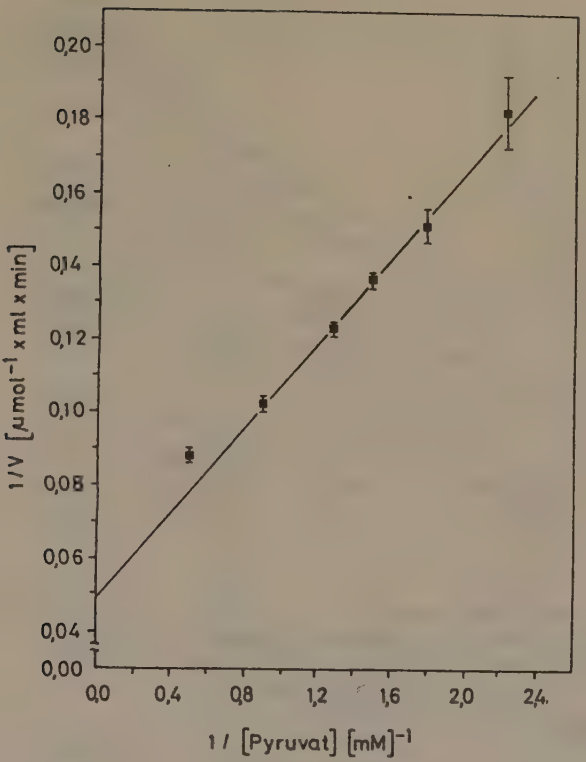


Abb.9c

Abb.9c: Hemmung von Pyruvat durch NAD^+, bei der nach Plowman gesättigten NADH Konzentration von 1,296 mM. Primäre, doppelt reziproke Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der reduktiven Aminierung von Pyruvat gegen die Konzentration von Pyruvat. Die Konzentration des Hemmstoffes NAD^+ wurde in sechs Schritten von 0,000 auf 1,134 mM erhöht. Es ließ sich keine Änderung der Anfangsgeschwindigkeit feststellen. In der Abbildung sind die Mittelwerte der Anfangsgeschwindigkeit bei verschiedenen Pyruvatkonzentrationen eingezeichnet.

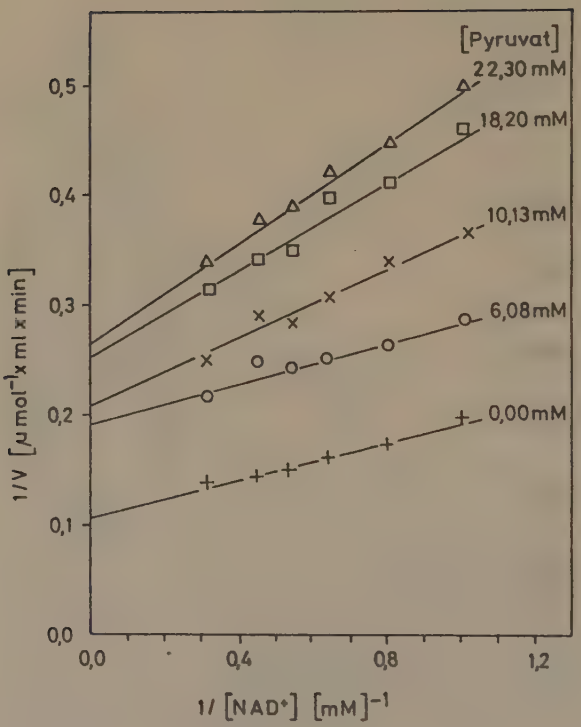


Abb. 10a

Abb.10a: Hemmung von NAD^+ durch Pyruvat, primäre, doppelt reziproke Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der oxidativen Deaminierung von Alanin gegen die Konzentration von NAD^+ bei einer konstant gehaltenen Alaninkonzentration von 51,32 mM. Die Konzentration des Hemmstoffes Pyruvat ist an den jeweiligen Geraden der Abbildung vermerkt.

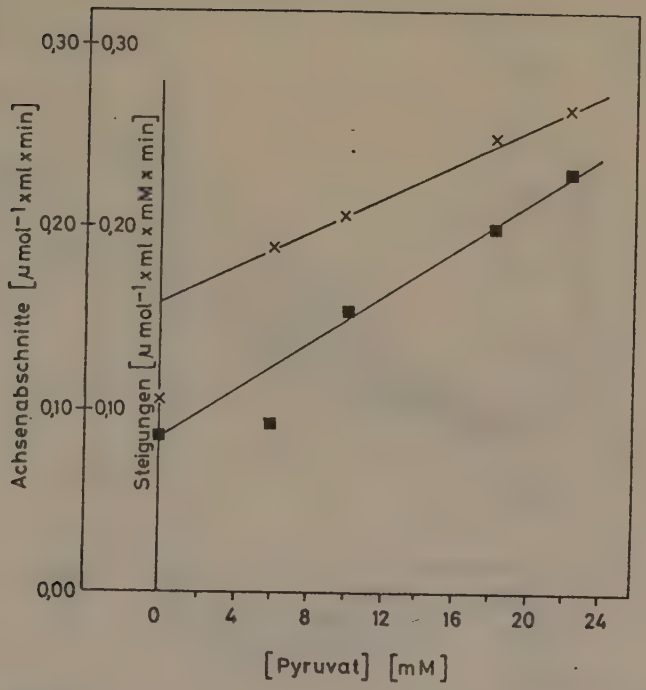


Abb. 10 b

Abb.10b: Sekundäre Auftragung der Achsenabschnitte bzw. Steigungen der Geraden von Abb.10a gegen die Konzentration des hemmenden Produktes Pyruvat.
—X —Achsenabschnitte
—■ —Steigungen
Aus der Abbildung 10b ergibt sich ein nicht kompetitiver Hemmtyp.

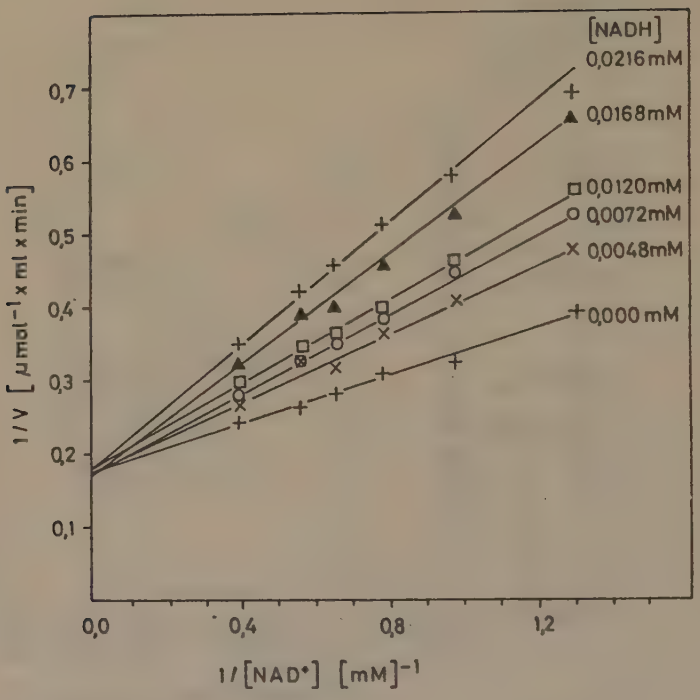


Abb.10c

Abb.10c: Hemmung von NAD^+ durch NADH,
Primäre, doppelt reziproke Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der oxidativen Deaminierung von Alanin gegen die Konzentration von NAD^+. Die jeweilige Konzentration von NADH ist an den Geraden der Abbildung vermerkt. Die Konzentration des konstant gehaltenen Substrates Alanin beträgt 13,18 mM.

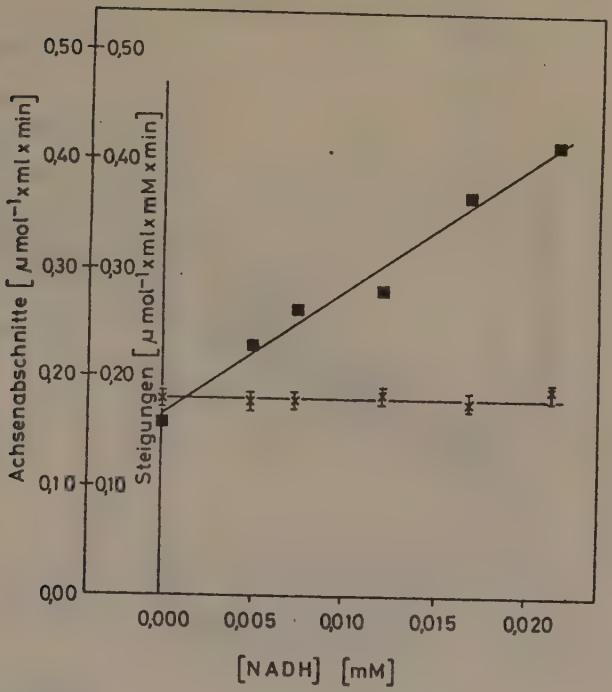


Abb. 10 d

Abb.10d: Sekundäre Auftragung der Achsenabschnitte bzw. Steigungen gegen die Konzentration des Hemmstoffes NADH.
—X—Achsenabschnitte
—■—Steigungen
Die Abbildung 10d zeigt das Bild eines kompetitiven Hemmtyps.

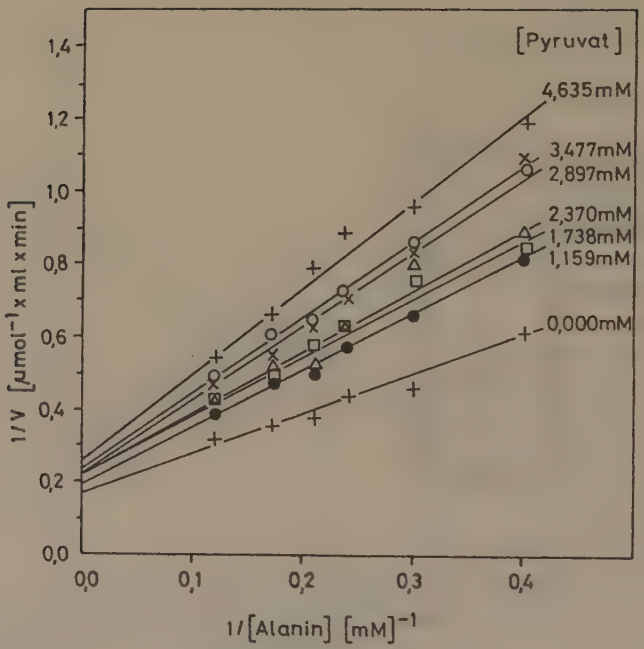


Abb.11a

Abb.11a: Hemmung von Alanin durch Pyruvat, primäre, doppelt reziproke Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der oxidativen Deaminierung von Alanin gegen die Konzentration von Alanin. Die NAD^+ Konzentration beträgt 1,9 mM. Die jeweiligen Hemmstoffkonzentrationen sind an den Geraden der Abbildung vermerkt.

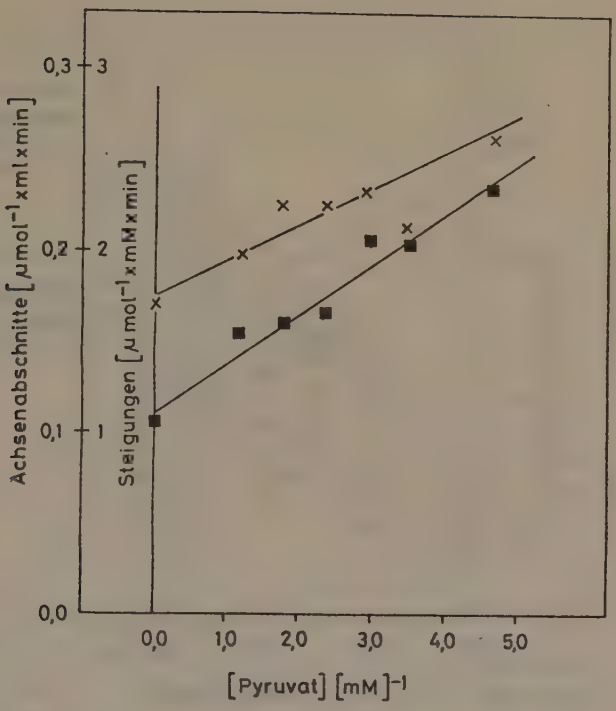


Abb. 11b

Abb.11b: Sekundäre Auftragung der Achsenabschnitte bzw. Steigungen der Geraden aus Abb.11a gegen die Konzentration des hemmenden Produktes Pyruvat.
—X—Achsenabschnitte
—■—Steigungen
Es ergibt sich das Bild einer nicht kompetitiven Hemmung.

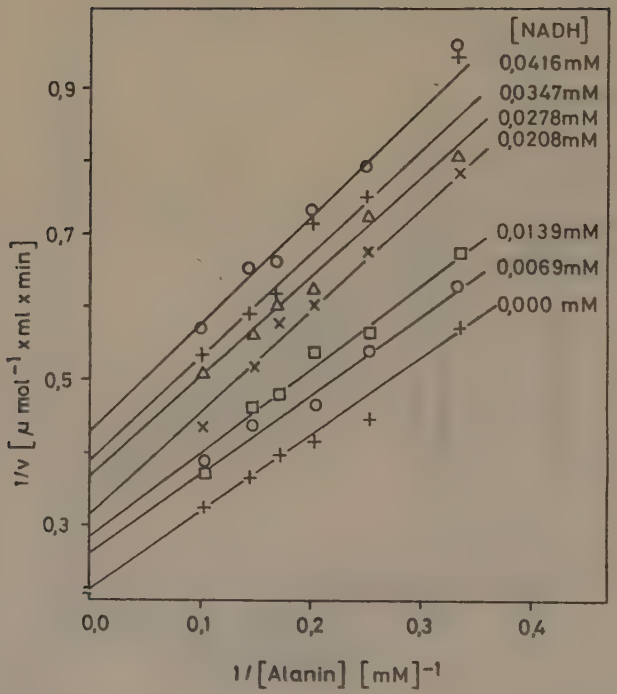


Abb. 11c

Abb.11c: Hemmung von Alanin durch NADH, doppelt reziproke, primäre Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der oxidativen Deaminierung von Alanin gegen die Konzentration von Alanin. Die konstant gehaltene NAD^+ Konzentration beträgt 2,10 mM. Die jeweilige Konzentration des Hemmstoffes NADH ist an den Geraden der Abbildung vermerkt.

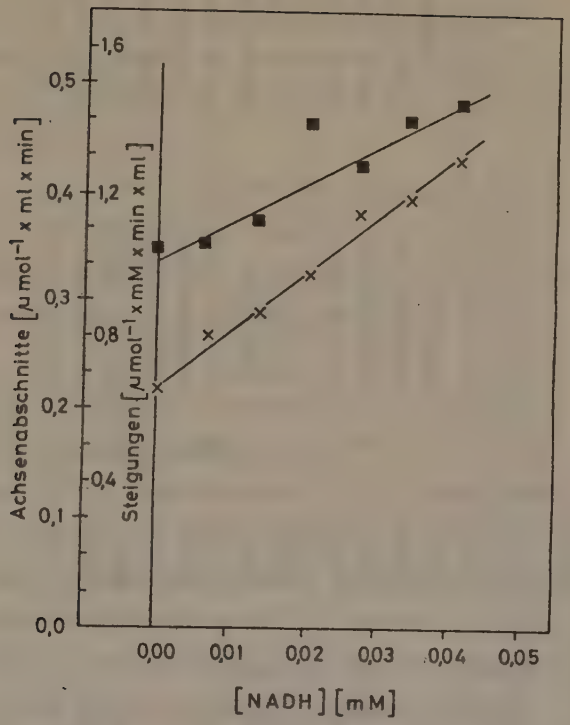


Abb.11d

Abb.11d: Sekundäre Auftragung der Achsenabschnitte bzw. Steigungen der Geraden von Abb.11c gegen die Konzentration des Hemmstoffes NADH.
—X —Achsenabschnitte
—■ —Steigungen
Es ergibt sich eine nicht kompetitive Hemmung.

Tabelle 3: Ergebnisse der Produkthemmversuche

Reaktionsrichtung	variiertes Substrat	hemmendes Produkt	Konzentration des zweiten Substrates [1]	Hemmtyp
reduktive Aminierung von Pyruvat	NADH	NAD^+	ungesättigt	kompetitiv
	NADH	Alanin	ungesättigt	nicht kompetitiv
	Pyruvat	NAD^+	ungesättigt	nicht kompetitiv
	Pyruvat	Alanin	ungesättigt	nicht kompetitiv
	Pyruvat	Alanin	gesättigt	nicht kompetitiv
	Pyruvat	NAD^+	gesättigt	keine Hemmung meßbar
oxidative Deaminierung von Alanin	NAD^+	NADH	ungesättigt	kompetitiv
	NAD^+	Pyruvat	ungesättigt	nicht kompetitiv
	Alanin	NADH	ungesättigt	nicht kompetitiv
	Alanin	Pyruvat	ungesättigt	nicht kompetitiv

[1] Im Sinne der Plowman Definition

3.3.3. Bestimmung der kinetischen Konstanten von Substratanalogen

Nach der unter 3.3.1. aufgeführten Methode werden die kinetischen Konstanten von Substanzen ermittelt, die als Analoge der Substrate und Cofaktoren der Alanin Dehydrogenase umgesetzt werden.

In Tabelle 4 sind die untersuchten Substratanalogen und die gemessenen kinetischen Konstanten zusammengestellt. Um besser vergleichen zu können, werden die Werte der entsprechenden Substrate mitaufgeführt.

3.3.4. Kinetische Untersuchung von Cofaktor analogen Substanzen

Als Analoge der Cofaktoren werden 1-N^6-Ätheno-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid = ε-NAD^+ und 8-(6-Aminohexyl)-Amino-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, sowie ATP, ADP und 8-(6-Aminohexyl)-Amino-Adenin-5'-Diphosphat geprüft. Diese Substanzen werden als Endgruppen bzw. als Endgruppen mit Spacer bei der Synthese von Affinitätsgelen eingesetzt, mit denen NAD^+/NADH abhängige Oxidoreduktasen gereinigt werden können. Von den NAD^+ Analogen werden die Michaeliskonstanten bestimmt. Um einen Vergleich zu haben, wird auch die Michaeliskonstante von NAD^+ unter denselben Bedingungen gemessen.

Cofactor bzw. Cofaktoanalog	Michaeliskonstante [mM]
NAD^+	0,592
ε-NAD^+	0,178
8-(Aminohexyl)- -Amino-NAD^+	0,500

Tabelle 4: Kinetische Konstanten für Substratanaloge ermittelt bei 37 °C und pH 9,0

Reaktionsrichtung	Salz	Substrat/Substratanaloges	K [mM]
reduktive Aminierung von Pyruvat	3,5 M NaCl	2-Oxobutyrat	0,585
		Pyruvat	0,956
		Oxalacetat	2,34
		Hydroxypyruvat	18,40
		2-Oxovaleriat	20,2
		Glyoxalat	246,oo
oxidative Deaminierung von Alanin	3,25 M KCl	L-Alanin	40,2
		L-2-Amino-butyrat	49,7

ADP, ATP und 8-(6-Aminohexyl)-Amino-ADP können bedingt als Analoge von NAD^+ angesehen werden. ADP - Affinitätsgele werden erfolgreich zur Reinigung von NAD^+/NADH abhängigen Oxidoreduktasen eingesetzt. Im Experiment mit der halophilen Alanin Dehydrogenase kann gezeigt werden, daß keine der genannten Substanzen umgesetzt wird und keine einen meßbaren Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat.

3.3.5. Untersuchung verschiedener Hemmstoffe

Hemmstoffe sind Substanzen, die die Umsatzgeschwindigkeit verringern. Es gibt eine Reihe von Substratanalogen, die von der Alanin Dehydrogenase aus H. salinarium nicht umgesetzt werden. Ein Teil dieser Stoffe muß als Hemmstoff bezeichnet werden. Experimentell erwies sich das Produkt Pyruvat als der stärkste Inhibitor von allen getesteten Substratanalogen.

Um vergleichbare Werte zu erhalten, werden alle zu untersuchenden Substanzen in derselben Konzentration eingesetzt. Der pH Wert wird auf 9,0 eingestellt.

Als Maß der Hemmwirkung wird jeweils der Faktor i berechnet (24). Er ist definiert als:

$$i = \frac{v_o - v}{v_o}$$

wobei v_o die Anfangsgeschwindigkeit ohne und v die Anfangsgeschwindigkeit mit Inhibitor bedeutet.

Die Untersuchung der Substanzen als Hemmstoffe wird in zwei Gruppen unterteilt:

a) Pyruvatanaloge

Bei einer Pyruvatkonzentration von 10,6 mM, einer NADH Konzentration von 0,246 mM, einer Meßtemperatur von 37 °C und in Gegenwart von 3,6 M NaCl werden die Anfangsgeschwindigkeiten der reduktiven Aminierungsreaktion in Anwesenheit oder Abwesenheit von 10,6 mM Hemmstoff gemessen. Der Grad der Hemmwirkung wird berechnet. Die Substanzen und ihre Hemmwirkungen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Prozentuale Hemmung von Pyruvatanalogen

Hemmstoff	i x 100%
D - Malat	3,9
L - Malat	0,2
2 - Oxoglutarat	0,0
L - Alanin	6,3

b) Alaninanaloge

Für die Reaktion in Richtung oxidative Deaminierung in Gegenwart von 3,25 M KCl werden folgende Werte für i erhalten:

(Meßbedingungen: Alaninkonzentration: 14,96 mM; Konzentration der zu untersuchenden Substanz: 14,96 mM; Meßtemperatur: 37 °C; NAD^+ Konzentration: 2,48 mM)

Die untersuchten Substanzen und ihre Hemmwirkung sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Prozentuale Hemmung von Alaninanalogen

Hemmstoff	i x 100%
L - Serin	0,3
Pyruvat	44,2
ß - Alanin	1,2
Sarkosin	0,0
D - Alanin	20,2
γ- Aminobuttersäure	2,8
Glycin	3,4
L - Cystein	2,2
L - Valin	0,0
D - 2 - Aminobuttersäure	4,1

4. Diskussion

Die Alanin Dehydrogenase wird aus H. salinarium gereinigt. Mittels Aussalzchromatographie an Sepharose 4B und DE52 - Cellulose sowie Hydroxylapatit- und hydrophober Chromatographie wird das Enzym gegenüber dem Rohextrakt um den Faktor 140 angereichert. Die so gewonnene Präparation ist über mehr als zehn Monate bei Lagerung bei 4 °C stabil und erwies sich als frei von Lactat - und Glutamat Dehydrogenase Aktivität.

Die Reaktionsgleichung der Alanin Dehydrogenase (1)

$$(1)\quad Pyr + NADH + NH_3/NH_4^+ \rightleftharpoons Ala + NAD^+ + H_2O$$

läßt sich formal durch folgende experimentelle Bedingungen vereinfachen:

Durch entsprechende Pufferung wird der pH - Wert während der Messung weitgehend konstant gehalten. Allen Meßansätzen wird dieselbe Menge an Ammoniumchlorid zugesetzt, so daß die Ammonium- bzw. Ammoniak Konzentration in allen Ansätzen stets gleich groß ist.

Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgt durch doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver & Burk (21). Für die Bewertung der Ergebnisse werden die Gleichungen für eine Zwei - Substrat - Reaktion herangezogen. Alle Auftragungen von Meßergebnissen sind linear. Deshalb kann die Gültigkeit folgender vereinfachter Reaktionsgleichung als bewiesen angesehen werden, sofern die Ammonium/Ammoniak Konzentration und der pH - Wert konstant gehalten werden (2) :

(2) $Pyr + NADH \rightleftharpoons Ala + NAD^+$

Die wichtigste Aufgabe der kinetischen Untersuchungen liegt in der Aufklärung des Reaktionsmechanismus.

Nach den Ergebnissen der Produkthemmung ist die Alanin Dehydrogenase Reaktion eine ordered bi-bi-reaction oder in der Benennung nach Laidler und Bunting (24) ein ordered ternary-complex mechanism. Aufgrund des Hemmschemas ist das erste gebundene Substrat, A, im Falle der reduktiven Aminierungsreaktion NADH, das zweite , B, Pyruvat, das erste freigesetzte Produkt, P, Alanin und das zweite, Q, NAD^+. Bei Vorliegen der oxidativen Deaminierungsreaktion wird unter Erhalt der Reihenfolge lediglich die Produkt- mit der Substratseite der vereinfachten Reaktionsgleichung vertauscht. Die Schemata der Abb.12 geben diese Verhältnisse wieder (22).

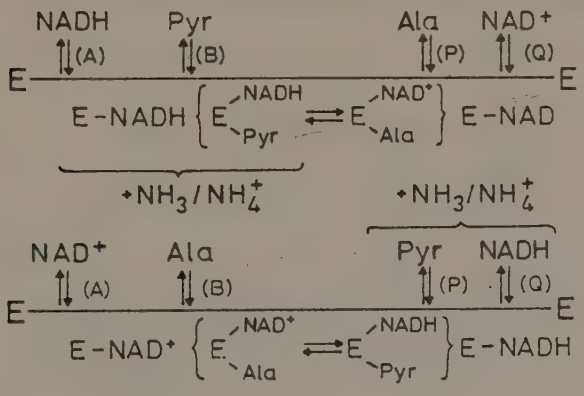


Abb.12: Reaktionsschemata für beide Richtungen der Alanin Dehydrogenase Reaktion.

Die gefundene Reihenfolge von Cofaktor und Substrat stimmt mit der von anderen Autoren bei der Glutamat Dehydrogenase, der Leucin Dehydrogenase und der Alanin Dehydrogenase aus anderen Organismen überein (30, 55 - 58). Diese Dehydrogenasen katalysieren eine Reaktion, die in Richtung reduktiver Aminierungsreaktion nach einem ternary-binary mechanism abläuft. Man kennt zwei kinetisch faßbare Reihenfolgen der Substrat - Cofaktor - Addition bei Aminosäure Dehydrogenasen dieses Typs.

Die erste Addition erfolgt durch den Cofaktor. Dieser Schritt ist bei beiden Formen des sequential ordered ternary-binary mechanism identisch. Das erste gebundene Substrat kann dann entweder die 2 - Oxoverbindung wie bei der Leucin Dehydrogenase (55) oder der NAD^+-spezifischen Glutamat Dehydrogenase (57, 58) sein oder Ammonium/Ammoniak wie bei der Alanin Dehydrogenase aus B. sphaericus (30) oder der $NADP^+$-spezifischen Glutamat Dehydrogenase (56). Das Schema in Abb.13 zeigt die beiden Möglichkeiten.

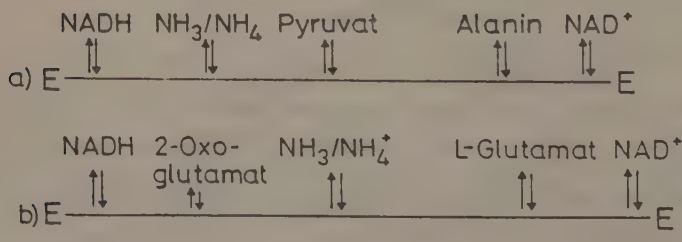
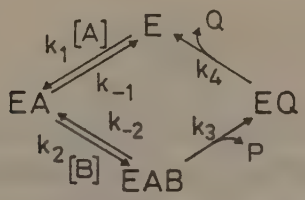


Abb.13a: Reihenfolge der Alanin Dehydrogenase Reaktion aus B. sphaericus

Abb.13b: Reihenfolge der Reaktion der NAD^+-spezifischen Glutamat Dehydrogenase

Bei allen Versuchen wird pro Ansatz die zugegebene Menge an Ammoniumchlorid nicht variiert, sondern konstant gehalten. Die Experimente lassen daher keine Aussagen zu diesem Problem zu. Da der Reaktionsmechanismus der halophilen weitgehend dem der nichthalophilen ähnelt, kann man vermuten, daß die Reaktion des halophilen Enzyms nach der Reihenfolge des Schemas der Abbildung 13a abläuft.

Laidler und Bunting geben folgendes Reaktionsschema für den ordered ternary-complex mechanism an:



Schema 1:

Unter der Voraussetzung, daß die Enzymformen E, EA und EAB im Gleichgewicht vorliegen und k_3 als Geschwindigkeits bestimmender Reaktionsschritt wesentlich langsamer abläuft als sich das Gleichgewicht einstellt, erhält man aus dem Schema 1 folgende Geschwindigkeitsgleichung (6) ($[E_o]$ bedeutet die Gesamtkonzentration an eingesetztem Enzym.)

$$v = \frac{k_3 \cdot k_4 / (k_3 + k_4) \cdot [E_o] \cdot [A][B]}{\frac{k_4 (k_{-1} \cdot k_{-2} + k_{-1} \cdot k_3)}{k_1 \cdot k_2 (k_3 + k_4)} + \frac{k_4 (k_{-2} + k_3)}{k_2 (k_3 + k_4)} [A] + \frac{k_3 k_4}{k_1 (k_3 + k_4)} [B] + [A][B]} \qquad (6)$$

Durch Vergleich mit der allgemeinen Form der Geschwindigkeitsgleichung können folgende mathematischen Definitionen für die Konstanten bei Vorliegen eines ordered ternary-complex mechanism gewonnen werden:

$$V_1 = \frac{k_3 \cdot k_4}{k_3 + k_4}[E_o]$$

$$K_A = \frac{k_3 \cdot k_4}{k_1(k_3 + k_4)}$$

$$K_B = \frac{k_4(k_{-2} + k_3)}{k_2(k_3 + k_4)}$$

$$K'_A = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

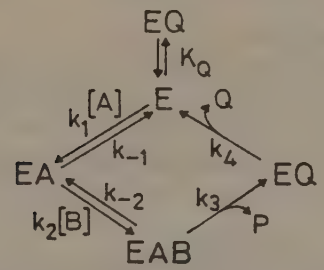
K'_A ist also die Dissoziationskonstante des zuerst gebundenen Cofaktors. K_A ist die Konstante des ersten Bindungspartners an das Enzym, also des NAD^+ oder des NADH. K_B ist die kinetische Konstante für jeweils das zweite bindende Substrat, also des Pyruvat oder des Alanin.

Die experimentell ermittelten Hemmtypen können mit Hilfe der Geschwindigkeitsgleichung (6) und dem Reaktionsmodell nach Schema 1 abgeleitet werden, wenn man annimmt, daß pro Enzymbindungsstelle nur jeweils ein Molekül Substrat oder Produkt gebunden werden kann. Die Produkte sind Strukturanaloge zu den jeweiligen Substratmolekülen und konkurrieren mit diesen um die freien Bindungsstellen am Enzym bzw. an den Enzymsubstratkomplexen. Bei Produkthemmung in einer Zwei - Substrat - Reaktion sind zwei

Fälle denkbar:

1. Das Produkt Q ist analog der Struktur des ersten gebundenen Reaktionspartners A
2. Das Produkt P ist strukturanalog zum zweiten Substrat B

Das Produkt Q kann nur mit der freien Enzymform E reagieren, denn bei den anderen Enzymkomplexen des ordered ternary--complex mechanism ist die Bindungstelle schon mit A oder Q besetzt. K_Q ist die Dissoziationskonstante des Komplexes EQ. Für die Hemmung mit dem Produkt Q muß deshalb Schema 2 formuliert werden:



Schema 2 :

In der Schreibweise nach Cleland lautet für Fall 1 der Produkthemmung die Geschwindigkeitsgleichung:

$$(7)\quad v = \frac{V_1 [A][B]}{K'_A \cdot K_B \left(1 + \frac{[Q]}{K_Q}\right) + K_A [B]\left(1 + \frac{[Q]}{K_Q}\right) + K_B [A] + [A][B]}$$

oder in der reziproken Form:

$$(8)\quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_1} + \frac{K_B}{V_1 [B]} + \frac{K_A}{V_1 [A]}\left(1 + \frac{[Q]}{K_Q}\right) + \frac{K'_A \cdot K_B}{V_1 [A][B]}\left(1 + \frac{[Q]}{K_Q}\right)$$

Wird im Versuch das erste Substrat A bei konstant gehaltenem zweiten Substrat B variiert, so ergibt sich, wie aus (9) ersichtlich eine kompetitive Hemmung:

$$(9)\quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_1} + \frac{K_B}{V_1} + \left\{ \frac{K_A}{V_1} \left(1 + \frac{[Q]}{K_Q} \right) + \frac{K'_A \cdot K_B}{V_1 [B]} \left(1 + \frac{[Q]}{K_Q} \right) \right\} \times \frac{1}{[A]}$$

Die primäre Auftragung von (9) liefert Geraden mit dem Schnittpunkt $1/V_1 + K_B/V_1$, die sekundäre Auftragung der aus dem primären Plot abgelesenen Steigungen gegen die Konzentration des Hemmstoffes Q liefert eine Gerade mit der Gleichung (10):

$$(10)\quad y = \frac{K_A}{V_1} + \frac{K'_A \cdot K_B}{V_1 [B]} + \left\{ \frac{K_A}{V_1 K_Q} + \frac{K'_A \cdot K_B}{V_1 [B] K_Q} \right\} [Q]$$

woraus sich K_Q berechnen läßt.

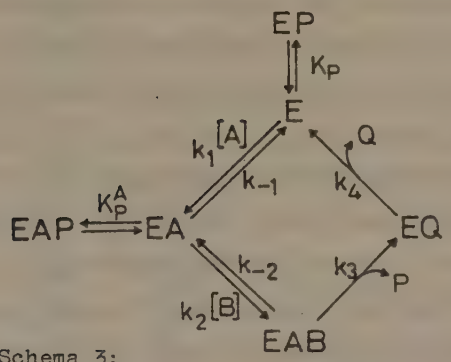
Wird dagegen die Konzentration des ersten Substrates A konstant gehalten und die von B variiert, so erhält man die reziproke Form der Geschwindigkeitsgleichung (8) in der Form (11):

$$(11)\quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_1} + \frac{K_A}{V_1 [A]} \left(1 + \frac{[Q]}{K_Q} \right) + \left\{ \frac{K_B}{V_1} + \frac{K'_A \cdot K_B}{V_1 [A]} \left(1 + \frac{[Q]}{K_Q} \right) \right\} \cdot \frac{1}{[B]}$$

Für verschiedene Hemmstoffkonzentrationen [Q] ergeben sich Geraden, wobei die Achsenabschnitte und die Steigungen direkt proportional zu [Q] sind. Es ergibt sich das Bild einer nicht kompetitiven Hemmung. Die sekundären Auftragungen der Achsenabschnitte und der Steigungen des primären Plots gegen die Konzentration von Q ergeben wiederum Geraden, aus denen K_Q berechnet werden kann.

Verwendet man an Stelle des zweiten freigesetzten Produktes Q das zuerst freigesetzte P als Hemmstoff, so

gilt nach Laidler und Bunting folgendes Schema (3) :



Schema 3:

Das Produkt P kann sowohl an die freie Form des Enzyms, E, wie auch an die Bindungsstelle von B, die noch im binären Komplex EA unbesetzt ist. Als Geschwindigkeitsgleichung erhält man in diesem Fall (12):

$$(12)\quad v = \frac{V_1[A][B]}{(K'_A \cdot K_B + K_A[B])\left(1+\frac{[P]}{K_P}\right) + K_B[A]\left(1+\frac{[P]}{K_P^A}\right) + [A][B]}$$

und in der reziproken Form (13):

$$(13)\quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_1} + \frac{K_A}{V_1[A]}\left(1+\frac{[P]}{K_P}\right) + \frac{K_B}{V_1[B]}\left(1+\frac{[P]}{K_P^A}\right) + \frac{K'_A \cdot K_B}{V_1[A][B]}\left(1+\frac{[P]}{K_P}\right)$$

Experimentell sind wieder zwei Fälle denkbar, nämlich:

a) A = konstant; B = variabel

b) A = variabel; B = konstant

In beiden Fällen erhält man nicht kompetitive Hemmung. Die sekundären Auftragungen der Achsenabschnitte und Steigungen des primären Plots gegen die Hemmstoffkonzen-

tration P ergeben Geraden, woraus K_P^A und K_P berechnet werden können.

Die Untersuchung der Produkthemmung bei der Alanin Dehydrogenase umfaßt sowohl die reduktive Aminierungsreaktion wie auch die oxidative Deaminierungsreaktion. Die Meßwerte werden doppelt reziprok nach der Methode von Lineweaver und Burk aufgetragen, die Bestimmung des Hemmtyps erfolgt aus dem sekundären Plot der Achsenabschnitte bzw. Steigungen der Geraden der primären Auftragung gegen die Hemmstoffkonzentration. Aus den Geradengleichungen des sekundären Plots werden die verschiedenen Dissoziationskonstanten der hemmenden Produkte berechnet. Die Werte sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Untersuchungen der Substratspezifität bzw. der Hemmstoffeigenschaften von Substratstrukturanalogen erlauben in begrenztem Umfang Aussagen über den Aufbau des aktiven Zentrums. Ob eine Substanz von einem Enzym umgesetzt wird oder ob es eine Umsetzung hemmt, hängt davon ab, ob diese Substanz an bestimmte Bereiche des Enzyms bindet oder nicht. Eine wichtige Größe dafür stellt die Geometrie des Bindungsortes dar. Sie wird festgelegt durch die räumliche Anordnung der Aminosäurereste am Bindungsort, im weitesten Sinn also durch die Primärstruktur des Proteins, und durch die Anordnung von Ladungen. Der Bindungsort einer Substanz ist das aktive Zentrum, wenn dort Umsetzungen stattfinden.

Man kann Substratanaloge unterteilen, indem man Substrate, also Analoge, die besser oder schlechter umgesetzt werden, von Hemmstoffen trennt. Hemmstoffe sind

Tabelle 7: Dissoziationskonstanten der Produkte NAD^+, Alanin, Pyruvat und NADH (K_Q und K_P) mit dem freien Enzym, E, bzw. mit dem ersten Enzym-Substrat-Komplex, EA (K_P^A):

Reaktionsrichtung	Salz	Dissoziationskonstante [mM]
reduktive Aminierung von Pyruvat	3,5 M NaCl	$K_{P\text{-}Ala} = 44,0 \pm 23,0$ $K^A_{P\text{-}Ala} = 9,4 \pm 3,1$ $K_{Q\text{-}NAD^+} = 6,8 \pm 7,9$
oxidative Deaminierung von Alanin	3,25 M KCl	$K_{P\text{-}Pyr} = 2,7 \pm 0,7$ $K^A_{P\text{-}Pyr} = 3,1 \pm 3,5$ $K_{Q\text{-}NADH} = 0,0029 \pm 0,0026$

strukturanaloge Substanzen, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit dem physiologischen Substrat zwar an das aktive Zentrum oder seine Umgebung binden können, vom Enzym aber nicht umgesetzt werden.

Vergleicht man Enzyme aus verschiedenen Spezies, indem man ihre Substratspezifität untersucht, so ist bei gleicher Einteilung der Strukturanalogen in Substrate und Hemmstoffe der Schluß zulässig, daß die Geometrie des aktiven Zentrums aller untersuchter Enzyme sehr ähnlich sein muß. Die Bereiche der Primärstruktur, die den Bindungsort bilden, sind also sehr ähnlich. Weitergehende Aussagen können aus kinetischen Untersuchungen dieser Art nicht abgeleitet werden.

Die Untersuchung der Substratspezifität der Alanin Dehydrogenase aus H. salinarium liefert Ergebnisse, die weitgehend mit denen anderer Autoren übereinstimmt. Das gilt sowohl für nicht halophile Enzyme mit mehreren Untereinheiten (30, 59, 60), wie auch für die monomere Dehydrogenase aus H. cutirubrum (7).

Für alle bekannten Alanin Dehydrogenasen gilt: Es werden stereospezifisch nur die L - Formen umgesetzt, die entsprechenden D - Formen wirken als Hemmstoffe. Die Affinität zu Substraten in Richtung reduktiver Aminierungsreaktion nimmt mit wachsender Kettenlänge der 2 - Oxoverbindung ab. Unter allen Substanzen sind die Produkte der physiologischen Reaktion, nämlich Pyruvat bzw. Alanin die besten Hemmstoffe.

Aufgrund der Ergebnisse der Substratspezifitätsuntersuchung kann man annehmen, daß die Entwicklung

zur Halophilie zu keinen größeren Veränderungen der Primärstruktur in den Bereichen der Proteinkette geführt hat, die das aktive Zentrum bilden. Es muß jedoch feine Unterschiede geben, da die halophilen Enzyme bei Reaktion in Richtung oxidativer Deaminierung streng Kaliumionen abhängig sind. Diese Ionenspezifität oder aber diese große Abhängigkeit des Reaktionsgleichgewichtes von den vorliegenden Ionenkonzentrationen ist bei den nicht halophilen Enzymen nicht beobachtet worden.

Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit werden die Halobakterien vielfach mit den methanogenen Bakterien, Sulfolobus und Thermoplasma zu einer eigenen Gruppe, den Archaebakterien, zusammengefaßt. (65, 66, 67). Es ist denkbar, daß sich aus dem Vergleich der chemischen und physikalischen Eigenschaften von Enzymen aus verschiedenen Organismen weitere Beweise für diese Änderung der Systematik und für die Evolution von eukaryoten und prokaryoten Bakterien ergeben.

5. Zusammenfassung

1. Die Alanin Dehydrogenase für die kinetischen Untersuchungen wird aus Halobakterium salinarium gewonnen. Bei einer Ausbeute von 43 % beträgt der Anreicherungsfaktor ca. 140 fach.

2. Alle kinetischen Messungen werden bei konstantem pH - Wert und konstanter Ammoniumchloridkonzentration ausgeführt. Die Reaktionsgleichung der Alanin Dehydrogenase wird damit formal zu einer Zwei - Substrat - Reaktion.

3. Für alle Substrate und Cofaktoren werden die kinetischen Konstanten bestimmt. In Gegenwart von 3,25 M KCl sind die Werte geringfügig nieriger als in Gegenwart von 3,5 M NaCl.

4. Die Produkthemmungsuntersuchung ergibt das Hemmschema eines ordered ternary-complex mechanism oder nach der Terminologie von Cleland einer ordered bi-bi-reaction. Bei beiden möglichen Reaktionsrichtungen ist das erste vom Enzym gebundene Substrat der jeweilige Cofaktor.

5. Aus den Ergebnissen der Produkthemmung werden die Dissoziationskonstanten der hemmenden Produkte berechnet.

6. Die Substratspezifität der Alanin Dehydrogenase aus Halobakterium salinarium entspricht der von anderen

Enzymen aus nicht halophilen Organismen. Die kinetischen Konstanten der Substratanalogen von Pyruvat und Alanin und die Michaeliskonstanten der Strukturanalogen von NAD^+ werden bestimmt.

6. Verzeichnis der Abkürzungen

Pyr	Pyruvat
Ala	Alanin
NADH NAD^+	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduzierte und oxidierte Form
KPO_4-Puffer	K_2HPO_4/KH_2PO_4-Puffer
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V_1	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
[X]	Konzentration des Substrates X
K_x	kinetische Konstante des Substrates X
k_1, k_{-1}	Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- und Rückreaktion
E	freie Form des Enzyms
EA	Enzym-Substrat-Komplex für das erste gebundene Substrat A
EAB	Enzym-Substrat-Komplex von EA mit dem zweiten gebundenen Substrat B
EP	Enzym-Produkt-Komplex zwischen E und dem ersten Produkt P
EQ	Enzym-Produkt-Komplex zwischen E und dem zweiten Produkt Q

7. Literaturverzeichnis

1. Mohr, V., Larsen, H.
J. Gen. Microbiol. 31, 267 - 280, (1963)

2. Beisenherz,G., Boltze, H.J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfleiderer, G.
Z.Naturforsch. 8b, 555 - 577 (1953)

3. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275, (1951)

4. Maurer, H.R. in
"Disk - Elektrophorese", S. 42 - 43,
Verlag Walter de Gruyter + Co, Berlin 1968

5. Hunter, M.J., Ludwig, M.L. in
"Methods in Enzymology", Vol XXV,
pp. 584 - 586, Academic Press, N.Y. 1972

6. Keradjopoulos, D.
Dissertation, Bochum 1976

7. Kim, E.K., Fitt, P.S.
Biochem. J. 161, 313 - 320, (1977)

8. Levin, Ö. in
"Methods in Enzymology", Vol. XXII,
pp. 325 - 339, Academic Press, N.Y., 1971

9. Jennissen, H.P., Heilmeyer, L.M.G.Jr.,
Biochemistry 14, 754 - 760, (1975)

10. Svensson, B.
FEBS Lett. 29, 167 - 169, (1963)

11. Wilchek, M., Oka, T., Topper, Y.J.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1055 - 1058, (1975)

12. Werber, M.M.
Anal. Biochem. 76, 177 - 183, (1976)

13. Shaltiel, S., Er-El, Z.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 778 - 781, (1973)

14. Jost, R., Miron, T., Wilchek, M.
Biochim. Biophys. Acta 362, 75 - 82, (1974)

15. Dahlgren Caldwell, K., Axén, R., Bergwall, M.,
Olsson, I., Porath, J.
Biotechnol. Bioeng., Vol XVIII, pp. 1605 - 1614,
John Wiley & Sons, Inc., 1976

16. von der Haar, F.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 1009 - 1013, (1976)

17. Mevarech, M., Leicht, W., Werber, M.M.
Biochemistry 15 , 2383 - 2387, (1976)

18. Kaplan, N.O. in
"The Enzymes", Vol III,
p. 105, Academic Press, N.Y. & London 1960

19. Alberty, R.A.
J.Am. Chem. Soc. 75, 1928 - 1932, (1953)

20. Laidler, K.J., Bunting, P.S. in
"The Chemical Kinetics of Enzyme Action",
pp. 114 - 141, Clarendon Press, Oxford 1973, 2nd ed.

21. Lineweaver, H., Burk, D.
J. Am. Chem. Soc. 56, 658 - 666, (1934)

22. Cleland, W.W.
Biochim. Biophys. Acta 67, 104 - 137, (1963)
173 - 187, (1963)
188 - 196, (1963)

23. Plowman, M.K. in
"Enzyme Kinetics",
McGraw-Hill Book Company 1972

24. Laidler, K.J. Bunting, P.S.
p. 90, siehe 20.

25. Wiame, J.M., Piérad, A.
Nature (London) 176, 1073 - 1075 (1955)

26. Piérad, A., Wiame, J.M.
Biochim. Biophys. Acta 37, 490 - 502 (1960)

27. O'Connor, R.J., Halvorson, K.E.
Arch. Biochem. Biophys 91, 290 - 299, (1960)

28. Germanio, G.J., Anderson, K.E.
J. Bacteriol. 96, 55 - 60, (1968)

29. Lany, J. K.
Bacteriol. Rev. 38, 272 - 290, (1974)

30. Ohashima, T., Soda, K.
Eur. J. Biochem. 100, 29 - 39, (1979)

31. Meers, J.L., Pedersen, L.K.
J. Gen. Microbiol. 70, 277 - 286, (1972)

32. McCowen, S.M., Phibbs, P.V.Jr.
J. Bacteriol. 118, 590 - 597, (1974)

33. Freese, E., Park, S.W., Cashel, M.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 1164 - 1172, (1964)

34. Hermier, J., Rousseau, M., Zévaca, C.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 118, 611 - 625, (1970)

35. Yoshida, A., Freese, E.
Biochim. Biophys. Acta 92,33 - 45, (1964)

36. Lebeault, J.M., Zévaco, C., Hermier, J.
Bull. Soc. Chim. Biol. 52, 1073 - 1088, (1970)

37. Yoshida, A.
Biochim. Biophys. Acta 105, 70 - 85, (1965)

38. Yoshida, A.
Biochim. Biophys. Acta 147, 39 - 44, (1967)

39. Holmes, P.K., Halvorson, H.O.
J. Bacteriol. 90, 312 - 315, (1965)

40. Evans, H.J., Sorger, G.J.
Annu. Rev. Plant Physiol. 17, 47 - 76, (1966)

41. Christian, J.H.B., Waltho, J.A.
Biochim. Biophys. Acta 65, 506 - 508, (1962)

42. Ginzburg, M., Sachs, L., Ginzburg, B.Z.
J. Gen. Physiol. 55, 187 - 207, (1970)

43. Lany, J.K., Silverman, M.P.
Can. J. Microbiol. 18, 993 - 995, (1972)

44. Kushner, D.J.
Adv. Appl. Microbiol. 10, 73 - 97, (1969)

45. Liebl, V., Kaplan, J.G., Kushner, D.J.
Can. J. Biochem. 47, 1095 - 1097, (1969)

46. Lieberman, M.M., Lany, J.K.
Biochim. Biophys. Acta 245, 21 - 33, (1971)

47. Cheah, K.S.
FEBS Lett. 7, 301 - 303, (1970)

48. Hubbard, J.S., Miller, A.B.
J.Bacteriol. 99, 161 - 168, (1969)

49. Cazzulo, J.J.
FEBS Lett. 30, 339 - 342, (1973)

50. Hubbard, J.S., Miller, A.B.
J. Bacteriol. 102, 677 - 681, (1970)

51. Aitken, D.M., Wicken, A.J., Brown, A.D.
Biochem. J. 116, 125 -134, (1970)

52. Pugh, E.L., Wassef, M.K., Kates, M.
Can. J. Biochem. 49, 953 - 958, (1971)

53. Tomlinson, G.A.,Hochstein, L.J.
Can. J. Microbiol. 10, 698 - 701, (1972)

54. Larsen, H. in
"The Bacteria", Vol.IV, pp. 297 -342
Academic Press, Inc., N.Y.1962

55. Ohshima, T., Misono, H., Soda, K.
J. Biol. Chem. 253, 5719 - 5725, (1978)

56. Lé John, H.B., Jackson, S.G., Klassen, G.R., Sawula, R.J.
J. Biol. Chem. 244, 5346 - 5356, (1969)

57. Stevenson, R.M., Lé John, H.B.
J. Biol. Chem. 246, 2127 - 2135, (1971)

58. King, J., Wu, W.Y.
Phytochemistry 10, 915 - 928, (1971)

59. Yoshida, A., Freese, E.
Biochim. Biophys. Acta 96, 248 - 262, (1965)

60. O'Connor, R.J., Halvorson, H.O.
Biochim. Biophys. Acta 48, 47 - 55, (1961)

61. Gibbons, N.E. in
"Methods in Microbiology", Vol III B,
pp. 169 - 183, Academic Press, N.Y. 1969

62. Ginzburg, M., Ginzburg, B.Z., Toseeson, D.C.
J. Membr. Biol. 6, 259 - 268, (1971)

63. Oesterheld, D., Stoeckenius, W.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 7o, 2853 - 2857, (1973)

64. Oesterheld, D. in
"Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation"
pp. 79 - 84, Amsterdam: Elsevier, 1974

65. Thauer, R.K., Fuchs, G.
Naturwissenschaften 66, 89 - 94, (1979)

66. Fox, G.E.
Science 209, 457 - 463, (1980)

67. Woese, C.R., Gupta, R.
Nature 289, 95 - 96, (1981)

Tabellarischer Lebenslauf

Karl Arnold Hilgenstock
geboren am 23. Januar 1951

1957 - 1961	: Volksschule Süd in Sprockhövel
1961 - 1970	: mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium in Hattingen/Ruhr
1970	: Reifeprüfung
WS 70/71	: Beginn des Studiums der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
WS 75/76	: Abschluß als Diplom-Chemiker mit einer Diplomarbeit zum Thema: "Die Tryptophan--Synthase aus Escherichia coli" , verfaßt bei Herrn Prof. Dr. G. Pfleiderer, Abteilung Biochemie des chemischen Institutes der Ruhr-Universität Bochum
WS 76/77	: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum
SS 1978	: Ärztliche Vorprüfung
SS 1982	: Beginn des Praktischen Jahres am Prosper Hospital in Recklinghausen
18.04.1983	: Ärztliche Prüfung
24.05.1983	: Approbation als Arzt
07.09.1983	: Mündliche Prüfung zum Dr. med.

Copier u.Druck
L.Bongen
Uni-Center 253
4630 Bochum 1